



Universidad Autónoma de Madrid



**Universidad Autónoma de Madrid**

**Departamento de Física  
de la Materia Condensada**

**Facultad de Ciencias**

**Análisis estructural de los chrysovirus mediante  
criomicroscopía electrónica tridimensional:  
Estructura a resolución cuasi-atómica  
del virus de *Penicillium chrysogenum***

**- TESIS DOCTORAL -**

**Josué Gómez Blanco**

**Madrid, 2013**





Universidad Autónoma de Madrid



# Universidad Autónoma de Madrid

## Departamento de Física de la Materia Condensada

### Facultad de Ciencias

Memoria presentada para optar al grado de Doctor  
en Biofísica por

**Josué Gómez Blanco**

Universidad Autónoma de Madrid

Abril de 2013

#### **DIRECTORES DE TESIS:**

**Dr. José Ruiz Castón**  
CNB-CSIC

**Dr. Daniel Luque Buzo**  
ISCIII



CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA







El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC) bajo la dirección conjunta de los Drs. José Ruiz Castón y Daniel Luque Buzo. Su financiación corrió a cargo de una beca del CSIC dentro del programa de cooperación científica conjunta CSIC-Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de Cuba (CITMA).



## AGRADECIMIENTOS

El volumen de recuerdos que te vienen a la cabeza al escribir estas líneas siempre es enorme. Es difícil no olvidar ningún nombre cuando tantas personas han contribuido a este trabajo durante todo este tiempo.

Quiero agradecer a mis directores de tesis, Pepe Castón y Dani Luque, que tanto me han ayudado en estos años con su apoyo y consejos para mi formación profesional y personal. Gracias por todo, por hacerme sentir muy orgulloso de pertenecer a este grupo donde nace el conocimiento. También a Pepe Carrascosa y Jose Mari Valpuesta, por todo su esfuerzo y preocupación para que yo pudiera estar aquí, hoy, escribiendo estas líneas.

También quiero dar las gracias a todas aquellas personas que de una forma u otra me han ayudado en diferentes momentos para que este trabajo pudiese completarse. Dentro de este gran grupo, destacar a Roberto Marabini, por sus enseñanzas de procesamiento de imágenes, al Dr. Nikolaus Grigorieff por permitirnos usar su microscopio electrónico en la Universidad de Brandeis, a Axel Brilot por su ayuda en la adquisición de imágenes, y a Chen Xu, por su desinteresada ayuda. A los Drs. Nuria Verdaguer y Damiá Garriga del Institut de Biologia Molecular de Barcelona, por su ayuda en la construcción del modelo atómico y enseñanzas de cristalografía de rayos X, al Dr. Said Ghabrial de la University of Kentucky, por la cesión y purificación de las muestras virales. Al Dr. José Manuel González del Wellcome Trust Sanger Institute, por enseñarme que una secuencia es mucho más que eso. Y a los Drs. Fernando Guzmán y Ernesto Moreno y a todos los partícipes del proyecto CEAC, por su ayuda para realizar este trabajo en España.

A todos los compañeros del grupo “minilínea”: Ana, Carlos, Elena y Mariana, por soportarme, por su comprensión, por su cariño, por las discusiones, científicas o no, que siempre son de buen provecho. Por ser parte importante de mi vida en el día a día durante estos años. A mis grandes amigos de las comidas, Srdja, Morín, Sara, Elena, Jorge y Bego, por hacerme pasar un tiempo, corto pero intenso, de distracción, de bromas, de debate político y de fútbol.... A Srdja, por escucharme, por ayudarme con todo y “enseñarme” que Serbia es el país más importante del mundo. A Morín, por los debates sobre Cuba, por ver en él a un hombre íntegro, y un ejemplo a seguir del que me siento orgulloso de ser su amigo. A la parte española del grupo, de quien he aprendido mucho sobre “la madre patria”, y me han enseñado un nuevo idioma: el castellano.

A todos los integrantes del S0, S1 y S5: Encarna, Mar, Ana C., María, Rebeca, Vero, Marta, Alina, Ana B., Borja, Jaime, Marina, Elías, M<sup>a</sup> Ángeles, Charo, José Jesús, Ricardo, Rocío, Javi Conesa, Michele, Lucía, Javi Chichón y MariJose, por ser grandes compañeros.

A Jose Miguel, mi hermano, que siempre está ahí en todo momento para apoyarme en cualquier cosa. A mis amigos, dentro y fuera de Cuba, porque sin ellos no sería la persona que soy hoy.

A mi hermosa familia, capaz de entender todos los sacrificios que se hacen en la vida, y soportar la lejanía dándome todo su apoyo y comprensión en cualquier momento.

A mis padres, por darme la vida y todo su amor. Por aguantar tanto tiempo de separación, por darme fuerzas para seguir adelante.

Por último, agradecer a mi gran mujer, a mi otro yo, a mi punto de apoyo, a la persona que cada día me hace sentir más orgulloso de ser su marido, la que está a mi lado, no importa para dónde sople el viento, la que me da fuerzas cada día para seguir y hacer sacrificios imposibles. Va por ti.

## ABREVIATURAS

**3D:** tridimensional

**3DR:** reconstrucción tridimensional

**aa:** aminoácido

**ATCC:** colección americana de tipos celulares  
(*American Type Cell Collection*)

**CnCV1** chrysovirus 1 de *Cryphonectria nitschkei*

**CP** proteína de la cápsida (*capsid protein*)

**crioME:** criomicroscopía electrónica

**C-terminal:** carboxilo terminal

**CTF:** función de transferencia de contraste

**DLP** partículas de doble capa (*Dual Layer Particles*)

**DNA:** ácido desoxiribonucleico

**dsRNA:** ácido ribonucleico de cadena doble

**dsDNA:** ácido desoxiribonucleico de cadena doble

**FSC:** *Fourier Shell Correlation*

**IBDV:** virus de la bursitis infecciosa  
(*Infectious Bursal Disease Virus*)

**kb:** kilobase

**ME:** microscopía electrónica

**mRNA:** ácido ribonucleico mensajero

**MW:** peso molecular

**NMR:** resonancia magnética nuclear

**N-terminal:** Amino terminal

**ORF:** fase abierta de lectura

**pb:** par de bases

**PcV:** virus de *Penicillium chrysogenum*

**PDB:** base de datos de proteínas (*Protein Data Bank*)

**RdRp:** RNA polimerasa RNA dependiente

**RNA:** ácido ribonucleico

**SSE** Elementos de estructura secundaria  
(*Secondary Structure Elements*)

**ssRNA:** RNA de cadena simple

**T:** número de triangulación

**UTR:** región no traducida

## CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

<b>Alanina</b>	Ala, A	<b>Leucina</b>	Leu, L
<b>Arginina</b>	Arg, R	<b>Lisina</b>	Lys, K
<b>Ácido aspártico</b>	Asp, D	<b>Metionina</b>	Met, M
<b>Asparagina</b>	Asn, N	<b>Fenilalanina</b>	Phe, F
<b>Cisteína</b>	Cys, C	<b>Prolina</b>	Pro, P
<b>Ácido Glutámico</b>	Glu, E	<b>Serina</b>	Ser, S
<b>Glicina</b>	Gly, G	<b>Tirosina</b>	Tyr, Y
<b>Glutamina</b>	Gln, Q	<b>Treonina</b>	Thr, T
<b>Histidina</b>	His, H	<b>Triptófano</b>	Trp, W
<b>Isoleucina</b>	Ile, I	<b>Valina</b>	Val, V

## ÍNDICE

ABSTRACT	1
1. Introducción	3
1.1 Estructura de las cápsidas virales	5
1.2 La nucleocápsida de los virus dsRNA	9
1.3 La Familia Chrysoviridae	12
1.4. Estructura de la cápsida de PcV	14
1.5. Estructura de criome de cápsidas virales a resolución atómica	17
2. Objetivos	23
3. Materiales y Métodos	29
3.1 Purificación de virus	31
3.2 Ultraentrifugación analítica	31
3.3 Análisis bioinformático	32
3.4 Microscopía Electrónica	32
3.5 Procesamiento digital de imágenes	33
3.6 Detección y alineamiento de elementos de estructura secundaria	36
3.7 Construcción y refinamiento del modelo atómico	36
3.8 Análisis del modelo atómico de la CP de PcV.	38
3.9 Números de acceso de las estructuras de criomicroscopía electrónica	38
4. Resultados	39
4.1 Estructura del virus CnCV1	41
4.1.1 Estructura tridimensional del virus CnCV1	41
4.1.2 Estequiometría del virus CnCV1	41
4.1.3 Duplicación estructural de la CP de CnCV1	42
4.1.4 Análisis de las secuencias de las CP de CnCV1 y PcV	44
4.1.5 Comparación de las estructuras secundarias y terciarias de las CP de CnCV1 y PcV	46
4.1.6 Análisis del dsRNA del virus CnCV1	48
4.2 Criomicroscopía electrónica de virus icosaédricos a resolución cuasi-atómica	48
4.2.1 Criome de PcV obtenida en el microscopio Tecnai G <sup>2</sup> FEG 200 kV	48

4.2.2 CrioME de rotavirus obtenida en el microscopio Tecnai F30 FEG 300 kV	52
4.3 Análisis estructural del virus PcV a resolución cuasi-atómica	55
4.3.1 CrioME del virus PcV obtenida en el microscopio Tecnai F30 FEG 300 kV	55
4.3.2 Construcción de la cadena peptídica de la CP de PcV	59
4.3.3 Construcción y validación del modelo atómico de PcV	63
4.4 Análisis del modelo atómico de la CP de PcV	65
4.4.1 Modelo atómico de la CP de PcV	65
4.4.2 Interacciones proteína-proteína que estabilizan la cápsida de PcV	67
4.4.3 Interacción RNA-proteína de PcV	71
4.4.4 Ajuste del modelo atómico de la CP de PcV en el mapa de crioME de CnCV1	74
4.4.5 Duplicación estructural de la CP de la cápsida de PcV	76
4.4.6 Homología estructural de los dominios duplicados de PcV en la CP del virus L-A	76
5. Discusión	81
5.1 Arquitectura de la cápsida T=2	83
5.2 El linaje de los virus dsRNA: implicaciones evolutivas	85
5.3 Funciones de la cápsida T=2	91
5.4 Interacciones del dsRNA con la proteína de la cápsida de chrysovirus	92
5.5 Interacciones del dsRNA con la proteína de la cápsida de chrysovirus	93
6. Conclusiones	97
7. Bibliografía	101
8. Publicaciones	117



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

Figura 1. El número de triangulación (T)	7
Figura 2. Mapas tridimensionales de virus icosaédricos calculados a partir de imágenes de criome	8
Figura 3. Estructura de virus dsRNA	10
Figura 4. Proteínas de cápsidas T=1 obtenidas por rayos X y criome	11
Figura 5. Organización del genoma del virus <i>Penicillium chrysogenum</i>	13
Figura 6. Árbol filogenético de los chrysovirus basado en las secuencias de las RdRp o la proteína de la cápsida	14
Figura 7. Estructura de la cápsida T=1 de PcV y modelo del plegamiento de la CP	16
Figura 8. Estructura de la cápsida del virus L-A y su monómero Gag a diferentes resoluciones	19
Figura 9. Criome de los viriones de CnCV1	42
Figura 10. Estequiometría de los viriones de CnCV1	43
Figura 11. Estructura de la cápsida T=1 de CnCV1 y modelo del plegamiento de su proteína de la cápsida (CP)	44
Figura 12. Alineamiento de secuencia y predicción consenso de SSE de las CP de CnCV1 y PcV	45
Figura 13. Comparación estructural entre las CP de PcV y CnCV1	47
Figura 14. RNA genómico en el interior de CnCV1	49
Figura 15. Criome de PcV del microscopio Tecnai G <sup>2</sup> FEG 200 kV	51
Figura 16. Criome de DLP de rotavirus del microscopio Tecnai F30 FEG 300 kV	53
Figura 17. Promediado de los trímeros cuasi-equivalentes de VP6 de rotavirus	54
Figura 18. Criome de PcV del microscopio Tecnai F30 FEG 300 kV	57
Figura 19. Comparación de las CTFs de imágenes adquiridas en los microscopios Tecnai G <sup>2</sup> 200kV y Tecnai F30 300kV	58
Figura 20. Resolución de las 3DRs de PcV-300	59
Figura 21. Construcción del modelo de C $\alpha$ de la CP de PcV	60
Figura 22. Solución de discontinuidades en el modelo de C $\alpha$ de la CP de PcV	62
Figura 23. Registro de la secuencia de aminoácidos de la CP de PcV en el mapa de densidad	64

Figura 24. Modelo atómico de la CP de PcV	66
Figura 25. Organización y conectividad de los dominios A y B de la CP de PcV	67
Figura 26. Interacciones intramoleculares e intermoleculares de la CP de PcV	68
Figura 27. Interacciones intermoleculares en el eje de simetría de orden dos	69
Figura 28. Interacciones de la CP con el dsRNA de PcV	72
Figura 29. Análisis de los canales de la cápsida de PcV	73
Figura 30. Homología estructural de las CP de PcV y CnCV1	75
Figura 31. Duplicación estructural de los dominios de la CP de PcV	77
Figura 32. Homología estructural de los dominios duplicados de PcV con la CP de L-A	78
Figura 33. Comparación de los dímeros de las cápsidas T=2 de virus dsRNA y virus ssRNA	85
Figura 34. Linajes virales basados en comparaciones de estructuras de CP a resolución atómica	87
Figura 35. Comparación de las cápsidas de PcV y L-A	89
Figura 36. Comparación de las cápsidas de PcV, L-A y reovirus	90
Figura 37 Alineamiento de las secuencias de las CP de chrysovirus	92
Figura 38, Regiones conservadas de las cápsidas de chrysovirus	93
Figura 39, Estructura de las cápsidas de Pcv, RnQV1 y L-A	95

## TABLAS

Tabla 1. Densidad del empaquetamiento genómico en virus dsRNA	17
Tabla 2. Mapas de criome de virus icosaédricos a resolución cuasi-atómica	21
Tabla 3 Estadísticas del procesamiento digital para cada muestra	34
Tabla 4. Resolución de las 3DRs de Rotavirus	55
Tabla 5. Resolución de las 3DRs de PcV-300	59
Tabla 6. Interacciones entre los dominios de la CP de PcV	69
Tabla 7. Interacciones entre las subunidades de la cápsida de PcV	70
Tabla 8. Naturaleza de las interacciones de la CP de PcV	71

## ABSTRACT

Chrysovirus are fungal double-stranded RNA viruses with a multipartite genome comprised of four monocistronic dsRNA segments. Each segment is separately encapsidated in a similar particle. *Penicillium chrysogenum* virus (PcV) is the type species of the family *Chrysoviridae*. The PcV capsid is an authentic T=1 lattice formed by 60 subunits, and the capsid protein appears to be a repeated  $\alpha$ -helical domain, indicative of gene duplication. Whereas the PcV capsid protein has two motifs with a similar fold, most dsRNA virus capsid subunits consist of dimers of a single protein (a 120-subunit capsid). This ubiquitous stoichiometry provides an optimal framework for genome replication and organization. In addition, the capsid remains undisturbed throughout the viral cycle.

We report the three-dimensional structures by single-particle cryo-electron microscopy (cryo-EM) analysis of two chrysovirus, *Cryphonectria nitschkei* chrysovirus 1 (CnCV1) at subnanometer resolution and PcV at  $\sim 4$  Å resolution. Three-dimensional cryo-EM of CnCV1 at  $\sim 8$  Å resolution showed that the capsid protein (60 copies/particle) is formed by a repeated predominantly  $\alpha$ -helical core. The arrangement of many of these putative  $\alpha$ -helices is conserved in the PcV capsid protein. This unusual organization is thus a basic fold shared by chrysovirus, and the duplicated structural signature for CnCV1 and PcV capsid proteins might derive from a gene duplication event.

Our atomic model of the PcV virion from cryo-EM at  $\sim 4$  Å resolution is suitable for a nearly complete trace of the 982-amino-acid capsid protein. The full-atom model of the capsid showed the critical contacts among structural subunits that mediate capsid assembly, and specific RNA-protein interactions on the inner surface. Despite the lack of sequence similarity between the two halves, the capsid protein is an almost perfect structural duplication of a single domain in which most  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -chains matched very well. Superimposition of secondary structure elements showed, in addition to the N- and C-terminal arms, a single “hot spot” into which structural and functional variations can be introduced by insertion of distinct segments. Overlaying L-A capsid protein (a totivirus with an undivided genome) on either of the PcV elements, while maintaining the same spatial arrangement in the shell, highlighted the same conserved PcV motif and hot spot for insertions, in addition to two new insertion zones. Structural comparison of PcV and other dsRNA viruses suggested that the PcV conserved core is partially preserved in *Reoviridae*. Our analysis detects three preferential sites at which the complexity of the preserved  $\alpha$ -helical core might have increased and evolved to the highly varied structures observed today.

The near-atomic structure of the PcV capsid protein derived from cryo-EM data has allowed us to determine that its conserved core is a hallmark fold preserved in the dsRNA virus lineage.



## ***1. Introducción***



## 1.1 Estructura de las cápsidas virales

Los virus representan, probablemente, el ejemplo más extremo de la naturaleza donde se dispone de la forma más eficiente de una limitada capacidad de información genética. Esta optimización de recursos queda reflejada tanto en sus estrategias de multiplicación y diseminación, como en su propia construcción. Los virus deben utilizar, por tanto, principios generales simples para llevar a cabo sus funciones vitales (Harrison, 2007; Castón & Carrascosa, 2013).

En el caso de la construcción de la partícula viral la economía genética llega a una altísima sofisticación. Solamente una o unas pocas proteínas diferentes son necesarias para construir una compleja envoltura implicada en múltiples procesos: selecciona el ácido nucleico viral en el entorno celular, busca su salida, protege el genoma viral durante su transporte de un hospedador a otro, reconoce la siguiente célula huésped, se internaliza en ella y, finalmente, libera el ácido nucleico para su replicación. Además, todas estas funciones son compaginadas con elevadas tasas de mutación para evitar el sistema inmune en vertebrados. La visión de las cápsidas como estructuras cerradas inertes, meros contenedores del material genético, es poco adecuada ya que experimentan profundas modificaciones estrechamente relacionadas con el momento del ciclo vital del virus. La estructura de la cápsida puede ser considerada como un compromiso entre la estabilidad, necesaria para que los virus sobrevivan en el medio extracelular, y la inestabilidad, ya que debe ser capaz de convertirse en estructuras lábiles para liberar su genoma en la célula infectada (Baker et al., 1999; Prasad & Schmid, 2012).

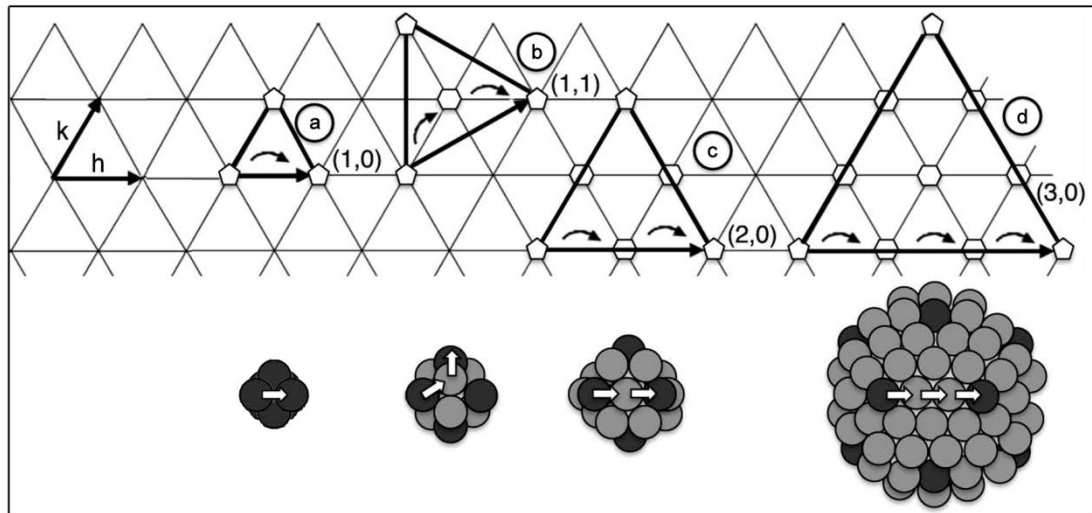
El ensamblaje eficiente de una partícula viral radica en dos aspectos: la aplicación de elementos de simetría y el polimorfismo natural de las proteínas estructurales (Cardone et al., 2009; Dokland, 2000; Gertsman et al., 2009; Steven et al., 2005). El uso de relaciones de simetría permite a partir de una serie de copias de una o unos pocos componentes proteicos, generar estructuras tridimensionales de forma y tamaños definidos. Las subunidades proteicas que forman las cápsidas interaccionan entre sí mediante enlaces no covalentes y en general débiles, con la excepción del bacteriófago HK97 donde las subunidades estructurales forman enlaces covalentes (Hendrix & Johnson, 2012; Popa et al., 1991). La estabilidad de la partícula viral se consigue por la cooperación de una gran cantidad de interacciones de tipo iónico, hidrofóbico, enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals, que se establecen al adoptar las subunidades proteicas posiciones determinadas por relaciones de simetría. Estas interacciones débiles son de enorme trascendencia ya que permiten una cierta flexibilidad en los contactos intersubunidades (contactos equivalentes pero no idénticos), lo que implica ligeras variaciones en la estructura tridimensional (3D) de las subunidades proteicas.

Excepto en los virus complejos, de las numerosas formas y tamaños entre las diferentes familias virales, las dos clases principales de simetrías observadas en las cápsidas son la simetría icosaédrica y helicoidal. La simetría helicoidal simplifica el ensamblaje de la cápsida, y es flexible en cuanto al empaquetamiento del genoma, sin embargo es relativamente ineficiente ya que menos del 10% de las familias virales tienen simetría helicoidal, siendo la mayoría virus de plantas y bacteriófagos (Abrescia et al., 2012; Baker et al., 1999; Bamford et al., 2005; Jiang et al., 2003).

El icosaedro es la partícula cerrada con simetría cúbica que permite posicionar el mayor número de subunidades asimétricas en su superficie manteniendo interacciones idénticas y, por tanto, es la estructura regular más económica en términos genéticos. Además, esta estructura presenta la relación superficie/volumen más baja, siendo por tanto el poliedro con la mayor capacidad de almacenamiento por unidad de información genética. Los virus icosaédricos pueden ser descritos mediante la teoría de la cuasiequivalencia y el concepto del número de triangulación (T) (Fig. 1) (Caspar & Klug, 1962). Los virus icosaédricos más simples están formados por 60 subunidades idénticas formando exclusivamente pentámeros (cápsidas T=1). Las cápsidas con más de 60 subunidades se ensamblan en pentámeros y hexámeros (Fig. 1) por lo que no pueden tener interacciones (o conformaciones) idénticas sino cuasiequivalentes (cápsidas con T>1).

En teoría la cuasiequivalencia implica pequeñas diferencias en las interacciones o conformaciones de las subunidades. En la práctica, los virus muestran un amplio rango de adhesión a este principio, y se han descrito cápsidas equivalentes, cuasiequivalentes y no equivalentes. El control de los diferentes estados conformacionales está modulado por diferentes factores denominados interruptores moleculares (del inglés “*molecular switches*”) que pueden ser segmentos peptídicos intrínsecos, regiones de RNA, iones metálicos, variaciones de pH, o distintas combinaciones de éstos (Johnson, 1996). Estos interruptores moleculares suelen ser insuficientes en la formación de cápsidas con elevados T (o virus complejos), y se requiere la participación de una o varias proteínas auxiliares, como proteínas de andamiaje, accesorias, o proteasas, que van a actuar como factores morfogénéticos (Dokland, 2000; Irigoyen et al., 2012; Morais et al., 2004). A pesar de la gran flexibilidad y posibilidades que ofrecen las cápsidas icosaédricas cuasi-equivalentes, en numerosas ocasiones se requiere de más de una proteína estructural. En estos virus no se puede hablar de cuasiequivalencia en sentido estricto, ya que las posiciones cuasiequivalentes están ocupadas por distintas proteínas, y se refieren como pseudo-números de triangulación (P) (por ejemplo P=3 en los picornavirus).



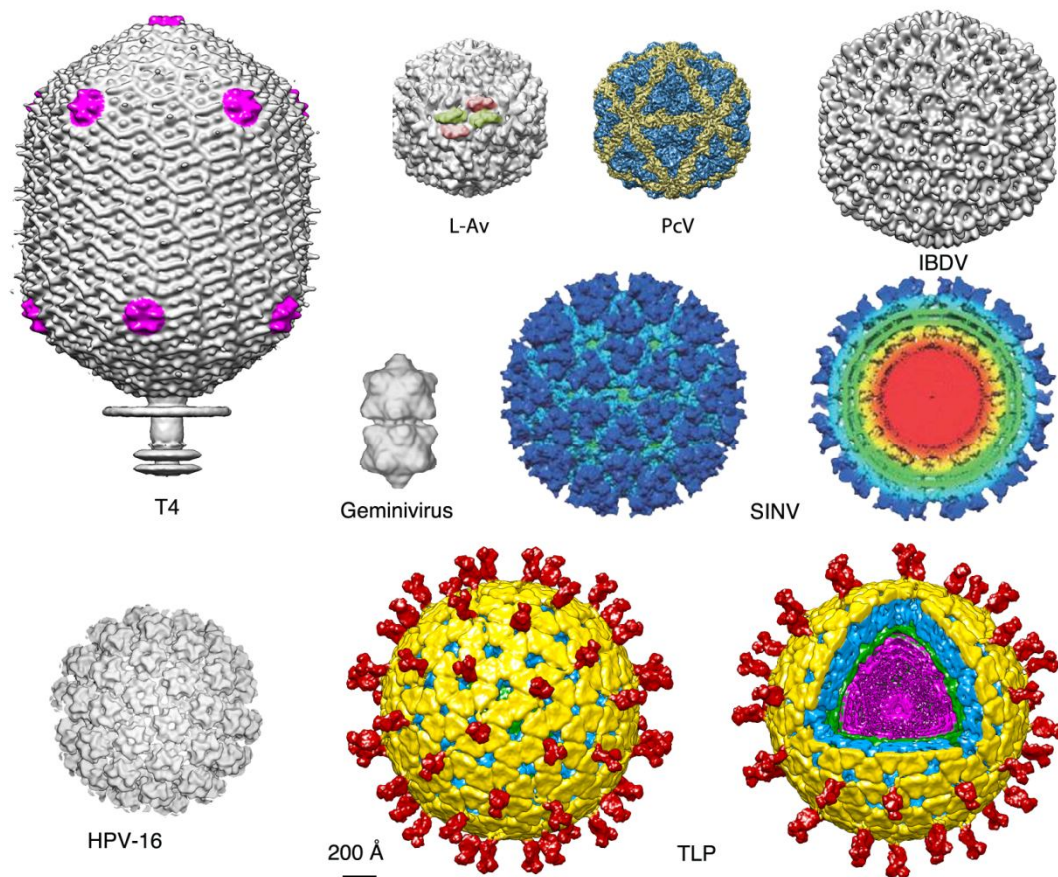


**Figura 1. El número de triangulación (T).** El sistema de coordenadas de una red plana hexagonal, con ejes  $h$  y  $k$  formando un ángulo de  $60^\circ$ , está formado por triángulos equiláteros; cada triángulo está formado por tres subunidades proteicas, y la conversión de un hexámero a pentámero introduce curvatura en la red plana hexagonal. Los capsómeros se localizan en los puntos de intersección de la red; los hexágonos representan hexámeros (posiciones hexaméricas planas) y los pentágonos se corresponden con pentámeros (convexos). Se indica la cara triangular (línea gruesa) de varios icosaedros (a, b, c y d), y una de las aristas del icosaedro (indicada por una flecha gruesa) une los dos pentámeros más próximos. Definiendo dos vectores unidad en la red,  $h$  y  $k$ , las coordenadas de la punta de la flecha con respecto a su origen determinan los parámetros de la cápsida. El número de pasos o separaciones (marcados con flechas curvas) de una unidad estructural (un hexámero o pentámero) a la adyacente es, por tanto, siempre un número entero. En el caso (a), un pentámero está separado del mas próximo por un paso a lo largo del eje del vector  $h$ ; por tanto,  $h = 1$ ,  $k = 0$  y  $T = 1$  (en este caso los 12 hexámeros adyacentes se han convertido en pentámeros). Los icosaedros más grandes se construyen mediante la conversión de 12 hexámeros no adyacentes en pentámeros, espaciados regularmente. En (b) un pentámero está separado de otro por un paso a lo largo del eje  $h$  y otro paso a lo largo del eje  $k$ ; por tanto  $h = 1$ ,  $k = 1$  y  $T = 3$  ( $T$  también muestra cuántos triángulos unidad existen en la cara fundamental del icosaedro). En (c) y (d) los pentámeros están separados por 2 y 3 pasos a lo largo del eje  $h$ , y  $T = 4$  y 9, respectivamente. Una cápsida  $T = 4$  tiene 240 subunidades y 4 subunidades proteicas cuasiequivalentes en la unidad asimétrica icosadétrica. Abajo: modelos tridimensionales que muestran cómo se determina  $T$ ; los capsómeros son de color negro (pentámero) y gris (hexámero).

Existen numerosas variaciones de virus icosadétricos (Fig. 2): muchos virus de RNA bicatenario (dsRNA) consisten en varias cápsidas icosadétricas concéntricas como los rotavirus (Pesavento et al., 2006; Settembre et al., 2011; Trask et al., 2012); otros virus icosadétricos tienen bicapas lipídicas intermedias entre cápsidas icosadétricas como los alphavirus (Jose et al., 2009); los bacteriófagos, como  $\phi 29$  y T4, tienen una cápsida icosadétrica prolada (o alargada) (Fokine et al., 2004); los geminivirus están formados por 2 cápsidas  $T=1$  fusionadas que carecen de un pentámero (Zhang et al., 2001), etc.

Existen notables excepciones que no siguen las reglas de la cuasiequivalencia (Steven et al., 1997). La cápsida  $T=7$  de papovavirus está formada exclusivamente por 72 pentámeros en lugar de 12 pentámeros y 60 hexámeros (360 subunidades se corresponderían con  $T=6$ , un número no

permitido) (Liddington et al., 1991; Rayment et al., 1982). En adenovirus, con cápsidas T=25, cada capsómero hexamérico es un trímero (Roberts et al., 1986). Otra excepción son las cápsidas internas de los virus dsRNA, una cápsida T=1 formada por 12 decámeros (la unidad asimétrica es un dímero). Estas cápsidas se corresponderían en una cápsida no permitida "T=2" (Caston et al., 2003). Numerosos estudios han demostrado, sin embargo, que esta arquitectura está extendida entre los virus dsRNA (Grimes et al., 1998; Naitow et al., 2002a; Reinisch et al., 2000).



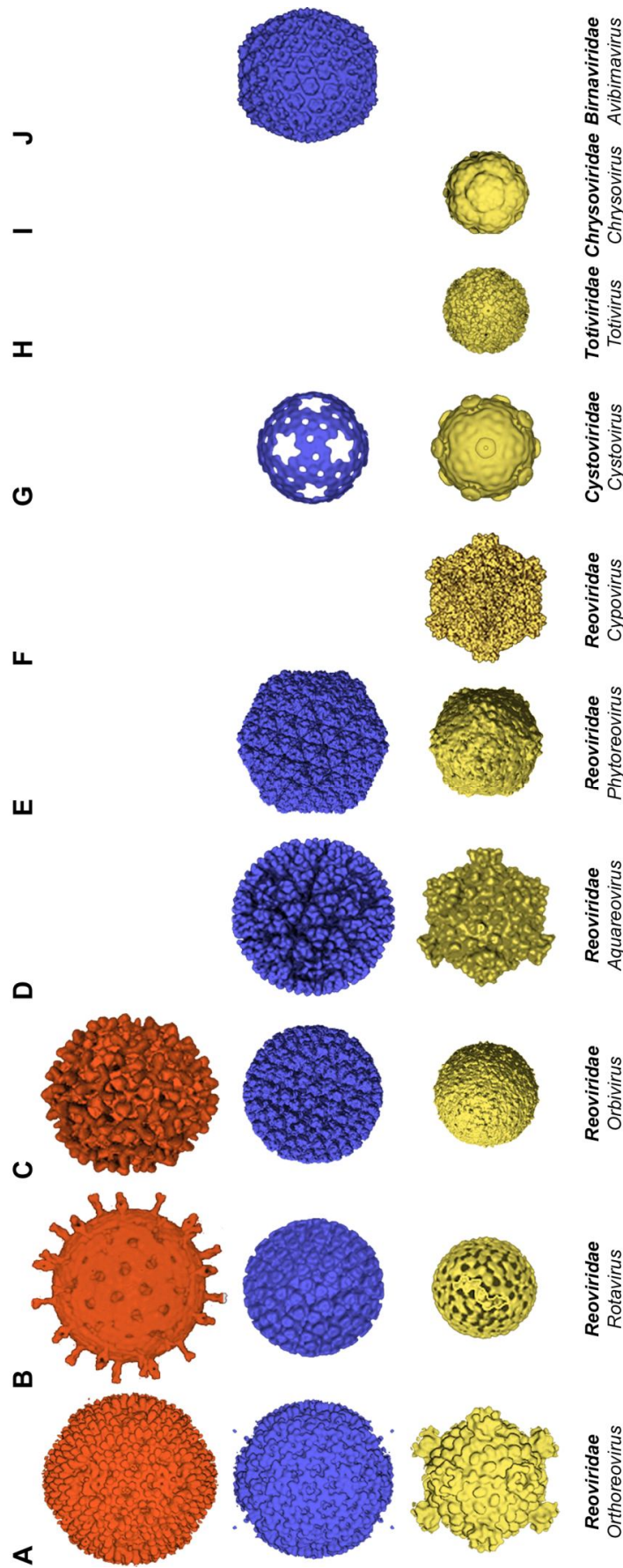
**Figura 2. Mapas tridimensionales de virus icosaédricos calculados a partir de imágenes de criome.** T4, cápsida del bacteriófago T4 (Fokine et al., 2004), visto perpendicularmente al eje de simetría de orden 5 (los vértices pentaméricos están en rosa). L-Av: totivirus L-A de *Saccharomyces cerevisiae*, con una cápsida "T=2"; la unidad básica es un dímero (rojo y verde) que ensambla en decámeros (Caston et al., 1997). PcV: virus del hongo *Penicillium chrysogenum*, con una cápsida T=1; la unidad básica es un monómero con dos dominios similares (azul y amarillo) (Luque et al., 2010). IBDV: virus de la bursitis infecciosa, con una cápsida T=13; la unidad morfológica básica son trímeros de VP2 (Castón et al., 2001b; Luque et al., 2007; Saugar et al., 2005). Geminivirus: formado por 2 cápsidas T=1 fusionadas, que carecen de un pentámero (Zhang et al., 2001). SINV: virus Sindbis, un alphavirus con una cápsida T=4 externa (azul), una bicapa lipídica intermedia (verde), y una cápsida interna T=4 en registro (amarillo) (Jose et al., 2009). HPV-16: papilomavirus humano 16, con una cápsida T=7 formada por 72 capsómeros pentaméricos (Buck & Trus, 2012). TLP: rotavirus con tres cápsidas concéntricas: las espículas están formadas por VP4 (rojo), la cápsida externa T=13 por VP7 (amarillo), la cápsida intermedia T=13 por VP6 (azul), la cápsida interna "T=2" por VP2 (verde), y la densidad interna (violeta) por complejos de polimerasas virales y dsRNA (cortesía de D. Luque y J.M. Rodríguez).

## 1.2 La nucleocápsida de los virus dsRNA

Los virus dsRNA constituyen un grupo muy diverso que infectan prácticamente a todos los organismos, desde los reovirus de mamíferos hasta el bacteriófago  $\phi 6$ , e incluye diversos virus de hongos y plantas. La organización estructural de la cápsida de los virus dsRNA es muy variada (Fig. 3), desde varias cápsidas concéntricas en registro (Grimes et al., 1998; Lu et al., 1998; Prasad et al., 1996; Shaw et al., 1996), hasta cápsidas únicas (Castón et al., 1997; Hill et al., 1999b).

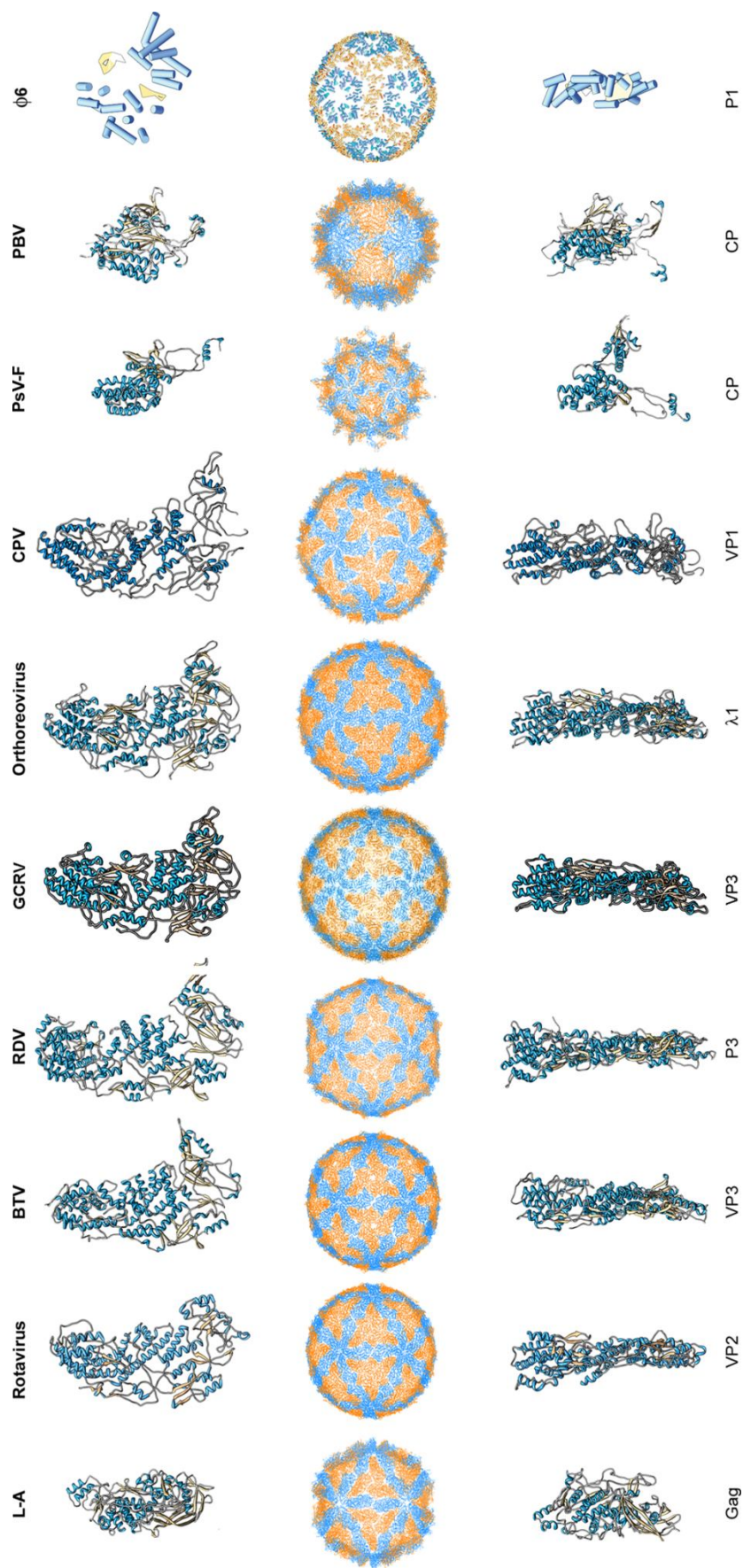
Los virus dsRNA comparten numerosos principios estructurales y funcionales que revelan estrategias comunes en su ciclo viral. El genoma de la mayoría de los virus dsRNA está contenido en una cápsida icosaédrica especializada con número de triangulación  $T=1$ , cuya unidad fundamental es un dímero, referida frecuentemente como cápsida " $T=2$ " (Fig. 4). Estas cápsidas son complejos funcionales implicados en la transcripción del dsRNA; y la liberación de transcritos ssRNA al citoplasma para su traducción. También participan en la replicación del dsRNA (síntesis de la cadena de polaridad negativa) ya que la RNA-polimerasa RNA-dependiente (RdRp) es empaquetada como un componente integral de la cápsida. La RdRp es incorporada como un complejo replicativo en cada vértice pentamérico en el caso de rotavirus (Estrozi et al., 2013; Li et al., 2009), como una proteína de fusión en el totivirus L-A (Castón et al., 1997), o como una proteína "soluble" en la cápsida como en el totivirus 190S de *Helminthosporium victoriae* (HvV190S) (Castón et al., 2006). La nucleocápsida  $T=1$  mantiene su integridad estructural a lo largo de todo el ciclo viral actuando como un microcompartimiento celular que aísla el dsRNA y los intermediarios replicativos de las moléculas vigía que constituyen las defensas intracelulares del huésped (Harrison, 2007).

Las primeras cápsidas  $T=1$  descritas con un dímero como unidad asimétrica fueron las de los totivirus L-A y P4 (Cheng et al., 1994) que infectan a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y al hongo *Ustilago maydis*, respectivamente. Estas cápsidas han sido también descritas en: (1) los virus de la familia *Reoviridae* (Cheng et al., 2010; Lawton et al., 1997b; McClain et al., 2010; Yu et al., 2008; Zhang et al., 2003), que infectan a organismos eucariotas superiores, (2) en la familia *Picobirnaviridae* (Duquerroy et al., 2009b), una familia recientemente establecida cuyos miembros infectan a humanos y otros vertebrados, (3) en la familia *Cystoviridae*, bacteriófagos que infectan a *Pseudomonas syringae* (Huiskonen et al., 2006; Jaalinoja et al., 2007), y (4) en las familias *Totiviridae* (Castón et al., 2006; Castón et al., 1997; Tang et al., 2008) y *Partitiviridae* (Ochoa et al., 2008), que infectan a eucariotas simples unicelulares, como hongos y protozoos. La estequiometría de estas cápsidas  $T=1$  y su arquitectura molecular asociada deben proporcionar un marco estructural óptimo para las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de RNA (Lawton et al., 2000a; Patton & Spencer, 2000; Trask et al., 2012).



**Figura 3. Estructura de virus dsRNA.** Mapas de densidad de cápsidas externas (fila superior en rojo y fila intermedia en azul) y nucleocápsidas T=2 internas (fila inferior en amarillo) de virus representativos de las diferentes familias de virus dsRNA. Bajo cada columna se indica la familia (negrita cursiva) y el género (cursiva) al cual pertenece el virus representado. (A) Ortoareovirus T1L (Dryden et al., 1998). (B) Rotavirus (Lawton et al., 1997c; Prasad et al., 1988; Shaw et al., 1993). (C) Virus de la lengua azul (BTV) (Grimes et al., 1998; Grimes et al., 1997). (D) Aquareovirus (Shaw et al., 1996). (E) Virus del arroz enano (RDV) (Nakagawa et al., 2003). (F) Virus de la poliedrosis citoplasmática (CPV) (Hill et al., 1999a). (G) Bacteriófago φ6 (Butcher et al., 1997). (H) Virus L-A (Caston et al., 1997). (I) Virus de *Penicillium chrysogenum* (PcV) (Caston et al., 2003). Virus de la Bursitis Infecciosa (IBDV) (Böttcher et al., 1997; Castón et al., 2001a). La nucleocápsida interna T=2 está presente en todas las estructuras resueltas (A-I) a excepción de IBDV (J).





**Figura 4. Proteínas de cápsidas T=1 obtenidas por rayos X y criome.** Fila superior: Proteína Gag (1m1c; 680 residuos), VP2 (3kz4; 880 residuos), VP3 (2btv; 901 residuos), P3 (1uf2; 1019 residuos), VP3 (3klq; 1027 residuos),  $\lambda$ 1 (1ej6; 1275 residuos), VP1 (3cnf; 1333 residuos), proteína de la cápsida de PsV-F (3es5; 420 residuos), proteína de la cápsida de PBV (2vfl; 590 residuos) y P1 (emd-1206; 769 residuos) vistas desde arriba. Fila central: cápsidas de los virus L-A, rotavirus, BTV, RDV, GCRV, orthoreovirus, CPV, PsV-F, PBV y el bacteriófago  $\phi$ 6 vistas desde el eje de simetría de orden 2. Fila inferior: Vistas laterales de las estructuras mostradas en la fila superior. La parte exterior de las proteínas se encuentra a la derecha. En las estructuras que provienen de mapas de criome los cilindros azules representan hélices  $\alpha$  y las hojas  $\beta$  por planos amarillos.

Se han descrito nueve cápsidas T=1 a resolución atómica (Fig. 4): las cápsidas internas de VP3 del virus de la lengua azul (un orbivirus, *bluetongue virus*, BTV) (Grimes et al., 1998) y del aquareovirus de la carpa herbívora (*grass carp reovirus*, GCRV) (Cheng et al., 2010), la cápsida de  $\lambda 1$  de reovirus en el género *Orthoreovirus* (Reinisch et al., 2000), la cápsida de P3 del virus enano del arroz (*rice dwarf virus*, RDV) (Nakagawa et al., 2003), la cápsida de VP1 del virus de la poleidrosis citoplásmica (*cytoplasmic polyhedrosis virus*, CPV) (Yu et al., 2008), la cápsida de VP2 de rotavirus (McClain et al., 2010), la cápsida del partitivirus F del hongo *Penicillium stoloniferum* (PsV-F) (Pan et al., 2009), la cápsida del picobirnavirus humano (PBV) (Duquerroy et al., 2009b) y la cápsida del virus L-A, constituida por la proteína Gag (Naitow et al., 2002a). Las similitudes de secuencia entre estas proteínas estructurales es muy baja y los análisis comparativos no son concluyentes. Sin embargo, todas las proteínas tienen un alto contenido en hélices  $\alpha$ . Mientras que las proteínas VP3,  $\lambda 1$ , P3, VP1 y VP2 presentan plegamientos muy similares entre sí, las proteínas de las cápsidas de PsV-F y PBV comparten un plegamiento similar, y la proteína Gag presenta una estructura terciaria distinta con ciertas semejanzas con las proteínas de reovirus (Reinisch, 2002).

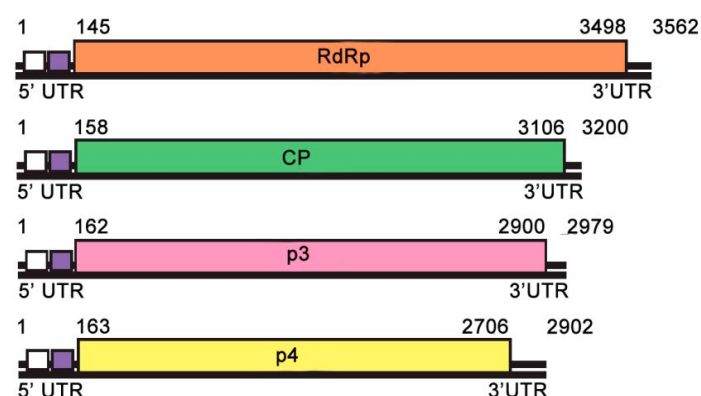
Los virus de la familia *Birnaviridae* constituyen una notable excepción entre los virus dsRNA, ya que carecen de la cápsida T=1 (Castón et al., 2008). Los birnavirus tienen una única cápsida T=13 (Coulibaly et al., 2005; Saugar et al., 2005; Vancini et al., 2012) que contiene un genoma poliploide de dsRNA (Luque et al., 2009a) organizado como complejos ribonucleoproteicos (Luque et al., 2009b). Otra excepción es el virus del hongo *Penicillium chrysogenum*, de la familia *Chrysoviridae*, que tiene una cápsida T=1 auténtica formada por 60 copias de una misma proteína en lugar de 60 dímeros (Castón et al., 2003).

### 1.3 La Familia *Chrysoviridae*

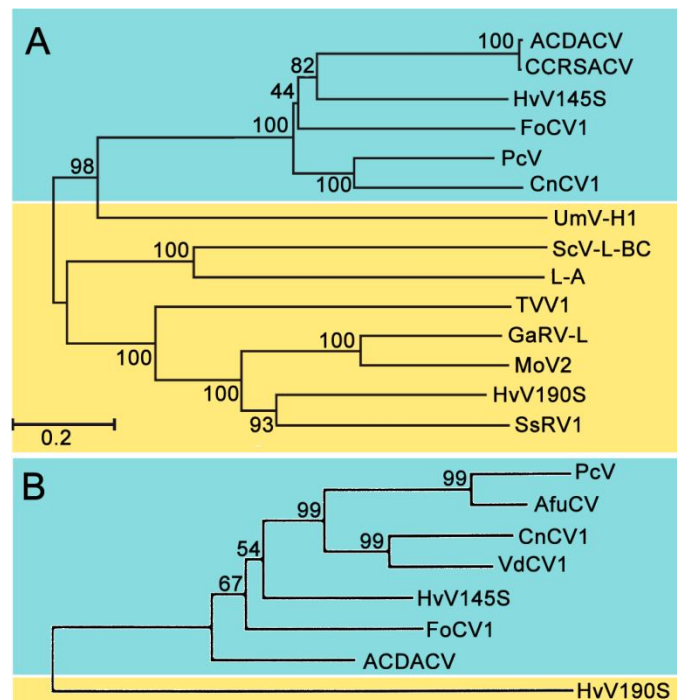
Los chrysovirus constituyen una familia de micovirus asociados con infecciones asintomáticas. Estos virus carecen de ciclo extracelular, se acumulan en el citoplasma del huésped y son transmitidos por vía intracelular durante la división celular y la esporogénesis (transmisión vertical), o mediante fusión citoplásmica por anastomosis hifal de cepas compatibles (transmisión horizontal) (Ghabrial & Castón, 2012). Los chrysovirus son virus icosaédricos carentes de envuelta lipídica y con un genoma constituido por cuatro segmentos monocistrónicos de dsRNA (el genoma del totivirus L-A es una única molécula de dsRNA). El análisis bioquímico de los viriones, así como su relación RNA-proteína indica que cada partícula viral encapsida sólo una molécula lineal dsRNA (Buck & Girvan, 1977; Wood & Bozarth, 1972).

El virus del hongo *Penicillium chrysogenum*, PcV, es la especie tipo de la familia *Chrysoviridae*. Su genoma está constituido cuatro segmentos dsRNA con tamaños desde 2.4 hasta 3.6 kpb (Fig. 5). Cada segmento contiene una única fase de lectura abierta (ORF) flanqueada en los extremos 5' y 3' por regiones no codificantes (UTR), altamente conservadas entre los cuatro segmentos de dsRNA (Jiang & Ghabrial, 2004). El segmento 1 (3.6 kpb) codifica la RdRp de 1117 aminoácidos (aa) (128 kDa) y presente en 1 ó 2 copias/virión. El segmento 2 (3.2 kpb) codifica la proteína de la cápsida (CP) de 982 aa (109 kDa). Los segmentos 3 y 4 (3 y 2.9 kpb, respectivamente) contienen ORFs que codifican las proteínas virales P3 y P4 de función desconocida (912 aa, 101 kDa y 847 aa, 95 kDa, respectivamente). La proteína P3 presenta cierta homología con la proteína P7 de phytoeovirus, con actividad de unión a ácidos nucleicos, y la proteína P4 contiene motivos similares a las cisteín-proteasas.

La RpRd de PcV tiene una alta homología de secuencia con las RpRd de otros chrysovirus como el chrysovirus 1 del hongo *Cryphonectria nitschkei* (CnCV1), el virus 145S de *Helminthosporium victoriae* (HvV145S), el chrysovirus 1 de *Fusarium oxysporum* (FoCV1), el chrysovirus asociado de la enfermedad de la cereza *Amasya* (ACDACV), y el chrysovirus asociado de las manchas cloróticas oxidadas de la cereza (CCRSACV) (Fig.6). La alineación múltiple de los motivos conservados en las RdRp indica que los chrysovirus están más estrechamente relacionados con los totivirus (con un sólo segmento genómico) que con los partitivirus (con dos segmentos de dsRNA) (Ghabrial & Castón, 2012). La RdRp se incorpora en el interior de la cápsida como una proteína "soluble", compartiendo ciertas analogías con las partículas del totivirus 190S del hongo *Helminthosporium victoriae* (HvV190S) (Castón et al., 2006), a diferencia del totivirus L-A, que la incorpora como una proteína de fusión con la proteína de la cápsida (Castón et al., 1997; Dinman et al., 1991).



**Figura 5. Organización del genoma del virus *Penicillium chrysogenum*.** El genoma consta de cuatro segmentos monocistrónicos de dsRNA. Las ORFs de la RdRp (nucleótidos de 145 a 3498, naranja), la CP (nucleótidos de 158 a 3106, verde), P3 (nucleótidos de 162 a 2900, rosado) y P4 (nucleótidos de 163 a 2706, amarillo) están representados por cajas rectangulares de colores. Las cajas blancas de las UTRs en 5' representan regiones altamente conservadas (40-75 nt). Las cajas violetas son regiones conservadas con repeticiones en la secuencia CAA (30-50 nt).



**Figura 6. Árbol filogenético de los chrysovirus basado en las secuencias de las RdRp o la proteína de la cápsida.** (A) Árbol filogenético basado en la secuencia completa de la RdRp de los chrysovirus (azul) y algunos miembros de la familia Totiviridae (amarillo) (Ghabrial & Castón, 2012). Los siguientes totivirus fueron incluidos en el análisis filogenético (abreviaturas en paréntesis): virus L de RNA de *Gremmeniella abietina* (GaRV-L), virus 190S de *Helminthosporium victoriae* (HvV190S), virus 2 de *Magnaporthe grisea* (MgV2), virus L-A de *S. cerevisiae* (L-A), y ScV-L-BC, virus 1 de RNA de *Sphaeropsis sapinea* (SsRV1), virus 1 de *Trichomonas vaginalis* (TVV1) y virus H1 de *Ustilago maydis* (UmV-H1). (B) Árbol filogenético basado en la secuencia completa de la CP de los chrysovirus y probables miembros de la familia Chrysoviridae (Ghabrial, comunicación personal).

#### 1.4. Estructura de la cápsida de PcV

La estructura tridimensional y estequiometría de la cápsida de PcV ha sido analizada mediante criomicroscopía electrónica (crioME) combinada con técnicas de reconstrucción tridimensional (3DR) y análisis biofísicos (Caston et al., 2003; Luque et al., 2010). La reconstrucción tridimensional de crioME (3DR crioME) de PcV ha sido obtenida a una resolución subnanométrica de 8 Å (Luque et al., 2010). La cápsida tiene un diámetro de 400Å, con un espesor promedio de 48 Å, y presenta una arquitectura T=1 cuya característica más prominente es la presencia de 12 pentámeros que sobresalen hacia el exterior (Fig. 7A, en color naranja). La cápsida tiene una superficie relativamente rugosa similar a la del virus L-A, pero distinta de la nucleocápsida de los reovirus que presentan una superficie lisa.

El análisis mediante ultracentrifugación analítica de viriones purificados de PcV permite una estimación independiente del número de copias de la CP (Caston et al., 2003). La especie predominante, ~80%, presenta un coeficiente de sedimentación estándar de  $135 \pm 10S$ . Este



valor es únicamente compatible con una partícula constituida por 60 monómeros de la CP, es decir se corresponde con una cápsida T=1 auténtica.

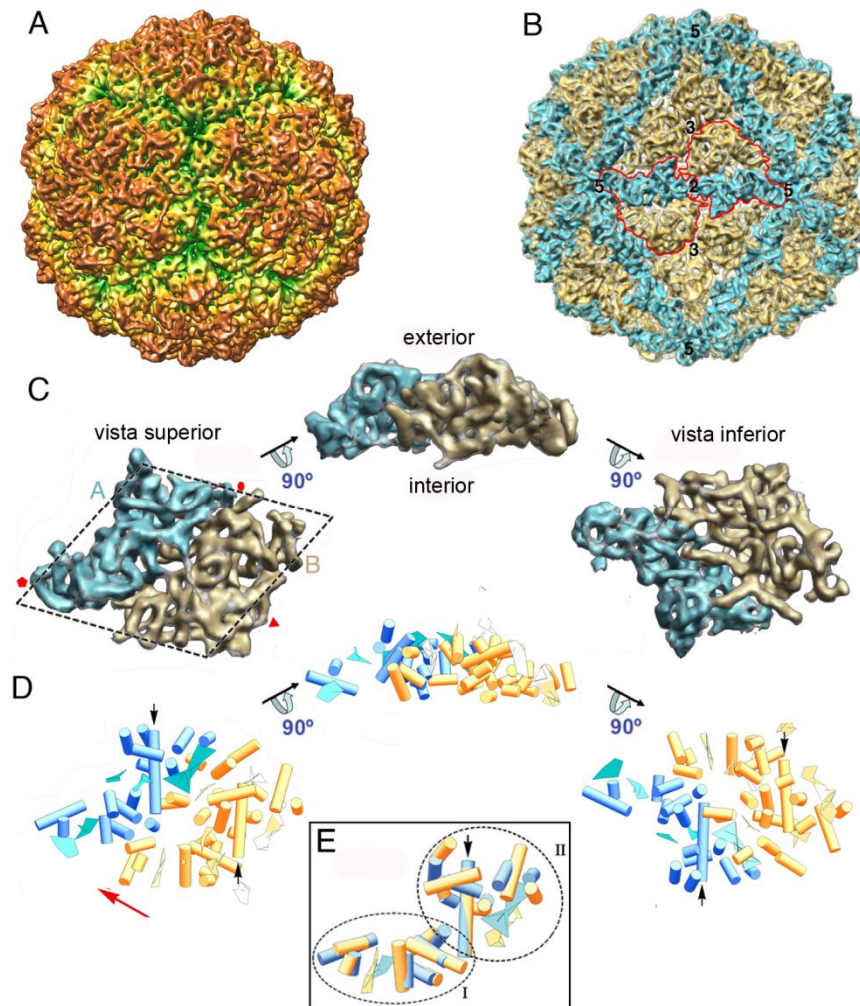
A 8 Å de resolución es posible establecer los límites moleculares de la subunidad asimétrica de la cápsida, es decir el monómero de la CP de PcV (Fig. 7B, línea roja). Dicha densidad, con forma de romboide (106 Å de ancho y 130 Å de largo) está formada por dos estructuras elipsoides con una morfología similar, aunque presentan diferencias en el tamaño (Fig. 7C). La denominada mitad A (Fig. 7C y D, azul), ocupa el 43% del volumen de la subunidad asimétrica, mientras que la denominada mitad B (Fig. 7C y D, amarillo) ocupa el 57% restante. Las dos mitades están dispuestas en dos grupos intercalados entre ellos alrededor del eje de simetría icosaédrica de orden cinco formando un pseudodecámero (Fig. 7B) con una organización cuaternaria similar a la de las cápsidas T=1 de 120 subunidades de reovirus y totivirus (Fig. 4).

El análisis de los elementos de estructura secundaria (SSE) determinados a partir de las densidades electrónicas, indica que la CP de PcV posee un alto contenido en hélices  $\alpha$ . La mitad A de la proteína contiene 16 hélices  $\alpha$  y 5 hojas  $\beta$ , mientras que en la mitad B se identifican 24 hélices  $\alpha$  y 7 hojas  $\beta$  (Fig. 7D). Ambas mitades, aunque no son idénticas, presentan una gran similitud estructural, y comparten una hélice  $\alpha$  de  $\sim 37$  Å de largo tangencial a la superficie de la cápsida (Fig. 7D, flechas negras). Una traslación de  $\sim 45$  Å de la mitad B con respecto a la mitad A fija (Fig. 7D, indicada por la flecha roja) permite la superposición de la mayor parte de los SSE, trece hélices  $\alpha$  y dos láminas  $\beta$  entre ambas mitades (Fig. 7E). Los SSE conservados pueden dividirse en dos regiones, denominadas I y II (Fig. 1.7E); la región I consta de un núcleo de cuatro hélices  $\alpha$  localizados hacia el eje de simetría de orden cinco, mientras que la región II contiene la hélice  $\alpha$  de  $\sim 37$  Å, una gran lámina  $\beta$  y otras hélices.

La similitud estructural observada entre ambas mitades sugiere una duplicación génica ancestral, aunque carecen de una similitud de secuencia. Esta unidad estructural se asemeja a la de las cápsidas T=1 formadas por 120 monómeros, y en cierto modo se corresponden con una estructura “pseudo-T=2”. Bajo estas consideraciones, la cápsida de PcV sigue la arquitectura conservada de las cápsidas “T=2” optimizadas para la replicación y organización del dsRNA. A este nivel de resolución subnanométrica es posible detectar una misma disposición de las hélices  $\alpha$  conservadas en las CP del totivirus L-A y las de PcV, sugiriendo la presencia de un motivo compartido. En este contexto, la resolución de la estructura de la CP de chrysovirus a resolución atómica sería clave para definir las relaciones evolutivas entre diferentes virus dsRNA.

Los virus dsRNA de hongos tienen cápsidas mucho más espaciales que las nucleocápsidas replicativas de los virus dsRNA de eucariotas complejos (Tabla 1). El dsRNA en el interior de las nucleocápsidas de reovirus está muy compactado, con una densidad del genoma promedio de

~40 bp/100 nm<sup>3</sup> (por ejemplo, los núcleos de BTV y de cypovirus) (Castón et al., 2013, *en prensa*). El dsRNA del virus L-A tiene una densidad interna de ~20 bp/100 nm<sup>3</sup> (Castón et al., 1997). Considerando el volumen disponible en el interior de la cápsida de PcV así como el tamaño promedio del genoma/cápsida de ~3200 bp, el dsRNA empaquetado tiene una densidad



**Figura 7. Estructura de la cápsida T=1 de PcV y modelo del plegamiento de la CP.** (A) 3DR crióME de la cápsida de PcV vista desde un eje de orden dos. La superficie se muestra coloreada radialmente. (B) 3DR de la cápsida representando la disposición espacial de las dos mitades, azul y amarillo, que componen la subunidad asimétrica. Se indican los límites de dos subunidades asimétricas (línea roja). Los ejes de simetría están numerados. (C) Subunidad asimétrica segmentada. Las líneas discontinuas indican la forma romboide de la subunidad asimétrica. La mitad A está en azul y la mitad B en amarillo. Los símbolos rojos indican los ejes de simetría. (D) Predicción de SSE a partir del mapa de densidad de la subunidad asimétrica. Cada mitad está representada con el mismo color y en la misma orientación que en el panel C. Los cilindros representan hélices  $\alpha$  y las superficies planares láminas  $\beta$  probables. Las flechas negras señalan las hélices de ~37Å. La flecha roja indica la traslación de la mitad B para ser superpuesta con la mitad A. (E) Superposición de los SSE comunes en cada mitad. La posición relativa de trece hélices  $\alpha$  y dos hojas  $\beta$  de ambas mitades es muy similar. Cada mitad es subdividida en las regiones I y II.

promedio similar a la del virus L-A. Además, el dsRNA de PcV está parcialmente ordenado ya que existen numerosas interacciones entre la superficie interna de la cápsida y el material genético subyacente (Luque et al., 2010). En conjunto, el bajo empaquetamiento del dsRNA debe facilitar el movimiento del segmento de dsRNA en las viriones durante la transcripción y replicación.

**Tabla 1. Densidad del empaquetamiento genómico en virus dsRNA<sup>1</sup>**

Familia de virus	Características del dsRNA			Características de la cápsida interna			
	Nº de segmentos	Long. <sup>2</sup> (kbp)	MW <sup>3</sup> (MDa)	T	f <sup>4</sup> (nm)	r <sup>5</sup> (nm)	Densidad dsRNA (bp/100 nm <sup>3</sup> ) <sup>6</sup>
<b>HSV<sup>7</sup></b>	1	~152	103.7	-	~60	43.0	46
<b>Reoviridae</b>							
<i>Orthoreovirus</i>	10	~23.5	16.0	2	~60	24.5	38
<i>Rotavirus</i>	11	~18.5	12.6	2	~52	23.5	34
<i>Orbivirus</i>	10	~19.2	13.1	2	~52	22.0	43
<i>Aquareovirus</i>	11	~23.6	16.0	2	~60	23.0	46
<i>Phytoreovirus</i>	12	~25.7	17.5	2	~57	26.0	35
<i>Cypovirus</i>	10	~31.4	21.4	2	~58	24.0	54
<b>Cystoviridae, φ6</b>	3	~13.4	9.1	2	~50	20.0	40
<b>Totiviridae, L-A</b>	1	~4.6	3.1	2	~43	17.0	22
<b>Patitoviridae, PsV-S</b>	1 (2)	~1.7 (3.3)	1.2 (2.2)	2	~35	12.0	23
<b>Chrysoviridae, PcV</b>	1 (4) <sup>8</sup>	~3.2 (12.6)	2.2 (8.6)	1	~40	16.0	19

<sup>1</sup> adaptado de Castón et al., 2003.

<sup>2</sup> Datos tomados de *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012).

<sup>3</sup> Peso molecular, calculado asumiendo una masa de 682 Da/bp.

<sup>4</sup> Diámetro externo; <sup>5</sup> Radio interno

<sup>6</sup> Densidades promedio asumiendo el volumen de una esfera e ignorando cualquier otro componente.

<sup>7</sup> Virus herpes simple (un virus de dsDNA)

<sup>8</sup> El genoma de PcV está formado por cuatro segmentos de dsRNA, pero los cálculos se realizaron asumiendo una molécula de dsRNA /partícula.

## 1.5. Estructura de criome de cápsidas virales a resolución atómica

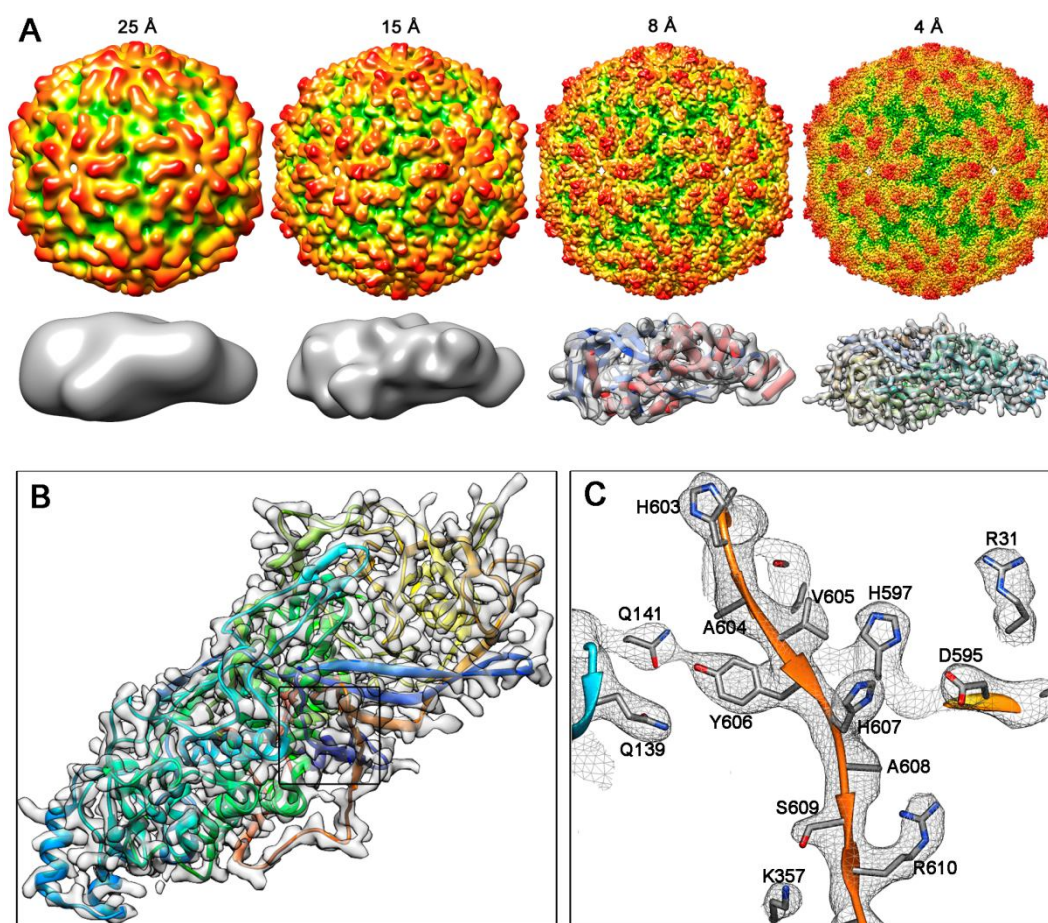
Las unidades funcionales en biología, las llamadas máquinas moleculares, son complejas asociaciones de macromoléculas altamente ordenadas que controlan todos los procesos biológicos fundamentales. La difracción de rayos X y la resonancia magnética nuclear (NMR) proporcionan las estructuras atómicas de los módulos o subunidades de estas máquinas moleculares (Ferentz & Wagner, 2000; Guntert, 1998; Smyth & Martin, 2000). Sin embargo, debido a la dificultad en la producción de suficientes cantidades y en la formación de cristales 3D de estructuras tan grandes y con flexibilidad intrínseca, no se han determinado muchas estructuras de estos complejos macromoleculares a resolución atómica en comparación con las estructuras de sus proteínas o módulos constituyentes (Berman et al., 2012; Velankar et al., 2012). La espectroscopía de NMR se encuentra también limitada por el tamaño de las moléculas

bajo estudio ( $\leq 50\text{kDa}$ ). En este contexto, la criome 3D representa el nexo de unión de la biología celular estructural y la biología molecular estructural de alta resolución, ya que facilita, en combinación con los métodos de alta resolución (la llamada aproximación híbrida), la comprensión de la estructura atómica en su contexto biológico, es decir la organización de sus componentes. La cristalografía de rayos X, la espectroscopía NMR y la criome son técnicas complementarias de análisis estructural. Recientemente se han descrito un número aún limitado de estructuras de ensamblados macromoleculares (especialmente virus) a partir de imágenes de criome a resoluciones en el rango de 3.5 - 4.5 Å (Grigorieff & Harrison, 2011; Zhou, 2011).

A estas resoluciones cuasi-atómicas muchos detalles estructurales pueden ser resueltos, incluyendo los surcos y pasos de rosca de las hélices  $\alpha$ , las distancias de interacción de 4.4 Å entre cadenas  $\beta$  (excepto en las zonas con interacciones por enlaces de hidrógeno), densidades de lazos (*loops*), y las cadenas laterales voluminosas de los residuos, así como el patrón en zigzag de los átomos de los carbonos  $\alpha$  separados por  $\sim 3.8$  Å (Yu et al., 2008) (Fig. 8). Estos datos estructurales pueden ser usados como referencias para trazar los esqueletos peptídicos (construcción del modelo de  $C\alpha$ ) usando herramientas de modelado molecular. La comparación entre estructuras derivadas de datos de criome con modelos derivados de cristalografía de rayos X indican que son prácticamente idénticas. Varios factores han contribuido sinérgicamente a este incremento en la resolución a partir de los datos de criome (Grigorieff & Harrison, 2011; Hryc et al., 2011; Zhou, 2008; Zhou, 2011):

1) **La muestra biológica.** Un requisito esencial para la determinación de estructuras por criome a resolución atómica es que el material bajo estudio sea estructuralmente homogéneo, lo que permitirá que las características estructurales puedan ser promediadas a partir de miles de imágenes de partículas idénticas. La homogeneidad estructural de la muestra es más importante que su nivel de pureza; mientras que las impurezas pueden ser fácilmente identificadas en las imágenes de criome, la heterogeneidad estructural es difícil de clasificar computacionalmente. La manipulación de muestras como la centrifugación a altas velocidades o procesos de congelación-descongelación pueden ser perjudiciales para la integridad estructural de grandes complejos, dando lugar a estructuras heterogéneas (desorden estructural). Estados dinámicos, (es decir, flexibilidad conformacional) también limitan la resolución. En este contexto, los virus icosaédricos son especímenes apropiados debido a que son estructuras regulares y rígidas.

2) **Condiciones de adquisición de Criome.** Las mejoras en la instrumentación de los criomicroscopios electrónicos han permitido trabajar con una fuente de electrones más estable, así como con brazos para las muestras con deriva mecánica muy reducida, de forma que estos factores no limiten la resolución atómica. Además, el haz de electrones incidente (habilitado con



**Figura 8. Estructura de la cápsida del virus L-A y su monómero Gag a diferentes resoluciones.** (A) Mapas de densidad de la cápsida de L-A filtrados a resoluciones de 25 Å, 15 Å, 8 Å y 4 Å, calculados a partir del modelo atómico de la proteína Gag (PDB 1M1C). En la fila inferior se muestran los mapas correspondientes de Gag. En el mapa filtrado a 8 Å se ajustó su modelo atómico, representando las hélices  $\alpha$  como cilindros rojos y las cadenas  $\beta$  como planos azules. A esta resolución se pueden distinguir densidades tubulares, asociadas a hélices  $\alpha$ , y densidades planares, asociadas a láminas  $\beta$ . El modelo atómico es ajustado en el mapa filtrado a 4 Å, donde se puede establecer la vorticidad de las hélices  $\alpha$ , la separación de las láminas  $\beta$  en cadenas  $\beta$ , y las cadenas laterales de los residuos voluminosos. (B) Mapa de Gag filtrado a 3.4 Å con el modelo atómico superpuesto en la densidad. El rango de la escala de colores va desde azul (el extremo amino terminal) hasta rojo (el extremo carboxilo terminal). (C) Ampliación de la zona marcada con el cuadro en el panel B. A 3.4 Å se pueden observar todos los residuos, y en algunos se distingue su morfología.

un cañón de emisión de campo y operado a 300 kV) debe ser perfectamente paralelo al eje óptico, ya que cualquier inclinación del haz introduce un desplazamiento en la fase de las imágenes (Smith et al., 1983). Sólo aquellas imágenes que dan lugar a patrones de difracción con anillos de Thon o “ceros” en su función de transferencia de contraste (CTF) visibles por encima de 5 Å de resolución deben ser seleccionadas (la resolución de una reconstrucción tridimensional normalmente es algo mayor que el valor indicado por el último anillo de Thon observado).

**3) Desarrollo de métodos computacionales para el procesamiento de imágenes con baja relación señal/ruido.** El refinamiento de la estructura es un proceso iterativo llevado en dos etapas: la determinación de los parámetros relativos a la orientación y centros de las imágenes basado en la asignación de proyecciones (*projection matching*), y el cálculo de la 3DR, incrementando gradualmente la resolución del mapa. Las imágenes con información de alta resolución son obtenidas generalmente en condiciones próximas a foco, y miles de estas imágenes, tomadas en condiciones de mínima dosis de electrones, son necesarias para "recuperar" las características de alta resolución, ya que las amplitudes correspondientes a altas frecuencias están muy atenuadas (equivalente a un factor de temperatura alto, o factor B en la cristalografía de rayos X). La resolución es calculada mediante el criterio de la *Fourier Shell Correlation* (FSC) (van Heel, 1984), o directamente sobre las características estructurales resueltas en el mapa reconstruido. Al igual que ocurre en las estructuras de rayos X, la resolución en las distintas regiones del mapa es variable, probablemente debido a diferencias locales en la flexibilidad intrínseca.

**4) Optimización y desarrollo de herramientas de modelado atómico con mapas derivados de criome.** Previamente al modelado atómico, se debe estimar empíricamente un factor B para evaluar características estructurales como el nivel de ruido, la continuidad de la cadena peptídica y las densidades de cadenas laterales. Este proceso puede mejorar las características de alta resolución y evitar amplificar excesivamente el ruido intrínseco de las altas frecuencias. A esta resolución, los componentes estructurales individuales de la cápsida son segmentados y constituye el punto de partida para la construcción del modelo atómico.

En el caso de cápsidas virales con  $T > 1$ , la calidad del mapa de las subunidades es mejorada mediante el promediando subunidades cuasiequivalentes (Zhang et al., 2008).

A resolución cuasi atómica ( $\sim 4 \text{ \AA}$ ), el trazado de la cadena peptídica es difícil y propenso a errores, ya que algunas densidades están ramificadas y las cadenas laterales son limitadas. También se pueden usar estructuras homologas obtenidas mediante modelados comparativos basados en secuencia. Posteriormente este modelo preliminar se puede refinar optimizando el ajuste entre el mapa de criome y el modelo homólogo (Cheng et al., 2010; Zhu et al., 2010). Además de las herramientas de modelado utilizadas en cristalografía de proteínas, existen otros métodos de modelado adaptados a las características de los mapas de densidad de criome (Baker et al., 2010; Ju et al., 2007). La evaluación de los modelos atómicos supone las mismas restricciones usadas en la cristalografía de rayos X (consistencia con la secuencia de la proteína, correcta quiralidad y el análisis del mapa de Ramachandran, entre otros). En cualquier caso, las incertidumbres son inevitables en la interpretación de mapas en  $3.5\text{-}4.5 \text{ \AA}$ . En numerosos casos los mapas de criome son una combinación de zonas con todos los residuos asignados (por



ejemplo, en regiones ricas en SSE) y zonas constituidas por el esqueleto de Ca de la cadena peptídica (regiones con densidades poco definidas).

El número de estructuras virales resueltas a resolución cuasi-atómica es aún limitado (Tabla 2). CPV fue el primer virus determinado a una resolución de 3.88 Å a partir de imágenes de criome, en el que se hizo un trazado *de novo* de la cadena peptídica. Otros ejemplos incluyen los rotavirus, cuyo modelo 3D de criome es equivalente al modelo de rayos X (Settembre et al., 2011; Zhang et al., 2008), el bacteriófago dsDNA  $\epsilon 15$ , relacionado con los bacteriófagos HK97 y P22 (Jiang et al., 2008), el papilomavirus bovino (resuelto a 3.6 Å de resolución), un virus dsDNA en el que se describen interacciones claves en el ensamblaje de la cápsida, el adenovirus humano, que muestra como las proteínas auxiliares actúan como cemento entre las proteínas estructurales de la cápsida icosaédrica, y el aquareovirus (a 3.3 Å de resolución), que reveló el mecanismo de activación para entrar en la célula huésped.

**Tabla 2. Mapas de criome de virus icosaédricos a resolución cuasi-atómica.**

Virus	Resolución (Å)	FSC	Imágenes	Software	Referencias
Papilomavirus bovino 1	3.6	0.143	3,997	FREALIGN	(Wolf et al., 2010)
Virus de la encefalitis equina venezolana	4.8	0.5	37,000	EMAN	(Zhang et al., 2011)
Bacteriófago $\epsilon 15$	4.5	0.5	36,259	EMAN	(Jiang et al., 2008)
GCRV	4.5	0.5	15,000	IMIRS	(Cheng et al., 2010)
Bacteriófago P22	3.8	0.5	23,400	IMIRS, EMAN	(Chen et al., 2011)
Rotavirus TLP	3.8	0.143	4,187	FREALIGN	(Settembre et al., 2011)
Adenovirus humano 5	3.6	0.5	31,815	IMIRS, EMAN	(Liu et al., 2010)
CPV	3.1	0.143	28,993	IMIRS, EMAN	(Yu et al., 2011)
Aquareovirus	3.3	0.143	18,484	FREALIGN, IMIRS	(Zhang et al., 2010)
Virus Sputnik	3.5	0.143	12,000	FREALIGN, EMAN	(Zhang et al., 2012b)
Virus del Dengue 2	3.6	0.143	32,596	EMAN	(Zhang et al., 2012a)

Teniendo en cuenta todos los factores implicados en la obtención de estructuras tridimensionales a resolución cuasi-atómica a partir de imágenes de criome, nos propusimos una revisión exhaustiva de estos procedimientos en el marco de nuestro entorno en el Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, que cuenta con una experiencia contrastada por varios grupos de investigación, tanto a nivel de criomicroscopía electrónica como de métodos de análisis de imágenes y reconstrucción tridimensional. La colaboración con el grupo del Dr. Grigorieff, que es pionero a nivel mundial en estos análisis, ha sido fundamental para el desarrollo de este trabajo. Como sistema modelo de partícula icosaédrica con potencial para ser estudiado por criome a alta resolución hemos utilizado el virus dsRNA del hongo *Penicillium Chrysogenum* (PcV), que llevamos analizando desde el año 2002, y disponemos de un mapa del virión a 8 Å de resolución.





## ***2. Objetivos***



La mayoría de los virus dsRNA comparten una cápsida especializada “T=2” con 120 subunidades (o 60 dímeros asimétricos) que participa en la replicación y transcripción del genoma. La estequiometría y topografía de esta cápsida proporciona un marco óptimo para los estrictos requerimientos del metabolismo del dsRNA. Sin embargo, la mayor parte de estos estudios se han realizado sobre miembros de la familia *Reoviridae*, habiendo muchos virus de hongos y protozoos aún sin caracterizar. La estequiometría y estructura tridimensional a resolución subnanométrica de la cápsida de PcV muestra un número de triangulación T=1, con 60 subunidades proteicas, lo que sugiere nuevas alternativas en cuanto a la arquitectura y funcionalidad de la cápsida T=2. La proteína de la cápsida de PcV presenta un dominio helicoidal repetido, lo que implica una posible duplicación génica.

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1.- Determinación de la estructura tridimensional del chrysovirus 1 de *Cryphonectria nitschkei* (CnCV1) para determinar si la organización estructural de PcV está extendida entre otros chrysovirus.
2. Determinación del modelo atómico de la cápsida del virus de *Penicillium chrysogenum* (PcV) a partir de imágenes de criomicroscopía electrónica para evaluar si el plegamiento de la proteína de su cápsida es una característica distintiva preservada en la mayoría de los virus dsRNA.



### ***3. Materiales y Métodos***



### 3.1 Purificación de virus

Las cepas NRRL 1951 de *Penicillium chrysogenum* (ATCC 9480) y OB5-11 de *Cryphonectria nitschkei* (ATCC 4105) se utilizaron para la obtención de viriones de PcV y CnCV1, respectivamente. En ambos casos, se recogieron micelios del hongo tras diez días de cultivo estacionario en medio de dextrosa de patata suplementado con 0.5 % (p/v) de extracto de levadura y fueron homogeneizados en un mezclador con tampón fosfato 0.1 M pH 7.4, 0.2 M KCl, 0.5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol. El homogeneizado fue mezclado en igual relación de volumen con cloroformo y centrifugado a 8,000xg durante 20 min. La fase acuosa fue sometida a dos ciclos de centrifugación diferencial a 27,000 rpm durante 150 min en un rotor Beckman tipo 30, y 10,000 rpm durante 10 minutos en un rotor Beckman JA-20, respectivamente. El sedimento de alta velocidad resultante fue resuspendido en 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, cargado en un gradiente lineal de sacarosa del 10-40% (p/v) y ultracentrifugado a 24,000 rpm durante 150 min en un rotor Beckman SW28. Tras la centrifugación, la banda correspondiente a los viriones fue recuperada mediante punción lateral, diluida con tampón y concentrada mediante centrifugación a 40,000 rpm durante 12 h en un rotor Beckman 50Ti. Este protocolo fue realizado por Wendy Havens, del laboratorio dirigido por el Dr. Said Ghabrial (Department of Plant Pathology, University of Kentucky, USA).

### 3.2 Ultracentrifugación analítica

Los experimentos de velocidad de sedimentación de los viriones purificados de CnCV1, fueron llevados a cabo a 20°C en una ultracentrífuga analítica XL-A (*Beckman-Coulter Inc.*), equipada con un sistema óptico de medida UV-VIS. Se empleó un rotor An60Ti equipado con celdas de doble sector de 12 mm de paso óptico y un volumen de muestra de 400  $\mu$ l, siendo el campo centrífugo de 10,000 rpm. La concentración de virus utilizada fue de 1 mg/ml y todas las medidas fueron realizadas en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA.

El análisis de los perfiles de sedimentación obtenidos se realizó mediante el ajuste directo de los mismos a las soluciones de la ecuación de Lamm con el programa SEDFIT (Schuck, 2000; Schuck et al., 2002). El mejor ajuste obtenido proporciona una distribución  $c(s)$  que representa la concentración inicial de especies que sedimentan con un coeficiente de sedimentación  $s$ . Los valores experimentales de sedimentación fueron corregidos a las condiciones estándar  $s_{20,w}$  mediante el programa SEDNTERP (Laue et al., 1992). Estos ensayos se realizaron conjuntamente en el Servicio de Ultracentrífuga Analítica bajo la supervisión del Dr. Carlos Alfonso (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid).

### 3.3 Análisis bioinformático

Las secuencias de las proteínas de la cápsida de los chrysovirus PcV (nº acceso Uniprot, Q8JVC1) y CnCV1 (C7EUC3) fueron alineadas a partir de MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>). Las predicciones de elementos de estructura secundaria fueron generadas a partir de los programas PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), Jnet (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>), Porter (<http://distill.ucd.ie/porter>), Sable (<http://sable.cchmc.org>), Gor ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/NPSA/npsa\\_gor4.htm](http://npsa-pbil.ibcp.fr/NPSA/npsa_gor4.htm)), Yaspin (<http://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/>), y Profsec (<http://www.predictprotein.org/>). Para cada posición de la secuencia se obtuvo una predicción consenso por mayoría simple

Los alineamientos múltiples de las secuencias de las proteínas de la cápsida de PcV (Q8JVC1), CnCV1 (C7EUC3), AfuCV (*Aspergillus fumigatus chrysovirus*, D8L7M0), VdCV1 (*Verticillium dahliae chrysovirus 1*, D6QSQ4), HvV145S (*Helminthosporium victoriae 145S virus*, Q8JVB6) y ACDACV (*Amasya cherry disease associated chrysovirus*, Q65A73) fueron realizados con distintos programas con resultados casi idénticos: Muscle [<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/muscle>, (Edgar, 2004)], Mafft [<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, (Katoh et al., 2002)], Expresso (T-Coffee) [<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee>, (Armougom et al., 2006)] y Promals3D [<http://prodata.swmed.edu/promals3d/>, (Pei et al., 2008)].

### 3.4 Microscopía Electrónica

La concentración óptima para el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de las muestras de PcV y CnCV1 fue determinada empíricamente mediante la dilución seriada de los mismos en su tampón correspondiente y tinción negativa. De forma general, 2-5 µl de la muestra bajo estudio fueron adsorbidos en una rejilla de microscopía electrónica con carbón-colodión previamente ionizada mediante descarga iónica (K100X, *Emitech*), lavada 2 veces en agua y teñidas con acetato de uranilo al 2% (p/v)

Para el análisis de viriones de CnCV1 y PcV en el criomicroscopio electrónico operado a 200 kV, 5 µl de la muestra bajo estudio fueron incubados sobre una rejilla de cobre-rodio cubierta con una película de carbón con agujeros *Quantifoil* R2/2 previamente lavada con vapores de acetona. Las muestras fueron vitrificadas en etano líquido a alta velocidad con un dispositivo *Leica* EM CPC según los procedimientos previamente establecidos (Dubochet et al., 1988). Para cargar las muestras en el microscopio se empleó un criobrazo *GATAN* modelo 626.53P50 y se visualizaron en un microscopio *Tecnai G<sup>2</sup> FEG 200 (FEI)*, estabilizado a 200 kV. Las imágenes se registraron a una magnificación nominal 62,000x bajo condiciones de mínima dosis



electrones en micrografías *Kodak* SO-163 que fueron reveladas (*Kodak* D-19) durante 12 min a temperatura ambiente.

El análisis de viriones de PcV en el criomicroscopio estabilizado a 300 kV fue llevado a cabo por el Dr. Daniel Luque (CNB-CSIC, ISCIII, Madrid) en el laboratorio del Dr. Nikolaus Grigorieff (Brandeis University, Chicago, USA). 2  $\mu$ l de viriones de PcV purificados fueron incubados sobre una rejilla de carbón con agujeros C-flat CF-1/2-4C (*Protochips*), ionizada mediante descarga iónica, y fueron vitrificados en un dispositivo FEI Vitrobot Mark II. Las muestras fueron cargadas para su visualización en un microscopio electrónico Tecnai FEG F30 estabilizado a 300 kV (FEI) con un criobrazo GATAN 626. Como paso previo al registro de imágenes y para asegurar la recuperación de fases a alta resolución, la inclinación del haz fue minimizada siguiendo el procedimiento del alineamiento libre de coma. Las imágenes se registraron a una magnificación nominal calibrada de 58,333x con una dosis electrónica de 20-25  $e^-/\text{\AA}$  en micrografías *Kodak* SO-163. La adquisición de las imágenes fue realizada con el programa SerialEM (Mastronarde, 2005) monitorizando una zona de sacrificio de forma que la deriva mecánica de la muestra está limitada a valores inferiores a 1  $\text{\AA}/\text{seg}$  durante la adquisición.

### 3.5 Procesamiento digital de imágenes

Las operaciones generales de procesamiento de imagen fueron llevadas a cabo mediante los paquetes de procesamiento Xmipp [<http://xmipp.cnb.csic.es/>] (Marabini et al., 1996), Bsoft [<http://www.niams.nih.gov/rcn/labbranch/lsbr/software/bsoft/>] (Heymann, 2001; Heymann & Belnap, 2007)] y Spider [[http://www.wadsworth.org/spider\\_doc/spider/docs/](http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/)], (Frank et al., 1996)]. Las criomicrografías electrónicas seleccionadas fueron digitalizadas en un *scanner* Nikon Super CoolScan 9000 ED y/o en un *scanner* Zeiss Photoscan TD según se indica en la Tabla 3. Las imágenes de partículas de doble capa (DLP) de rotavirus están libremente accesibles en la página web del laboratorio del Dr. Nikolaus Grigorieff [<http://emlab.rose2.brandeis.edu/>] (Zhang et al., 2008)].

Para obtener una mayor eficiencia computacional durante los pasos iniciales de procesamiento, las micrografías fueron submuestreadas 2x y 3x respecto a la frecuencia de muestreo original. Las imágenes de las partículas fueron seleccionadas manualmente de las micrografías digitalizadas mediante el programa X3d (Conway et al., 1993) y, posteriormente, extraídas y normalizadas con Xmipp (Tabla 3). El rango de desenfoque de las micrografías analizadas fue determinado por duplicado con los programas Bshow y ctffind3 (Mindell & Grigorieff, 2003) mediante el cálculo de la media radial de la transformada de Fourier promedio de la micrografía y de todas imágenes extraídas la misma (Tabla 3). Dicha información fue empleada para invertir

las fases de cada micrografía entre las frecuencias adecuadas de la función de transferencia de contraste (CTF) y agrupar las imágenes extraídas en XX grupos con distinto desenfoque.

**Tabla 3 Estadísticas del procesamiento digital para cada muestra**

Muestra	Microg <sup>1</sup>	Mag <sup>2</sup>	Scanner	Muestreo (Å/pixel)	Desenf. (µm) <sup>3</sup>	Partículas iniciales <sup>4</sup>	Partículas 3DR <sup>5</sup>
CnCV1	566	62,000	Nikon	1.024	0.9-4.2	18,732	16,858
PcV-200	482	50,000	Nikon	1.400	0.5-3.7	38,739	34,865
Rotavirus DLP	386	58,080	Zeiss	1.205	1.1-3.5	18,125	16,312
PcV-300 (Zeiss) <sup>6</sup> (llenas y vacías)	489	58,333	Zeiss	1.200	1.1-3.8	30,628	27,566
PcV-300 (Cápsidas llenas)	489	58,333	Zeiss	1.200	1.1-3.8	22,835	20,552
PcV-300 (Cápsidas vacías)	489	58,333	Zeiss	1.200	1.1-3.8	7,793	7,014
PcV-300(Nikon) <sup>7</sup> (llenas y vacías)	489	58,333	Nikon	1.089	1.1-3.8	30,628	27,566
PcV-300 (Ref.independiente) <sup>8</sup>	489	58,333	Zeiss	1.200	1.1-3.8	2x 15,314	2x 13,782

<sup>1</sup> Número de micrografías

<sup>2</sup> Magnificación

<sup>3</sup> Grado de desenfoque determinado experimentalmente.

<sup>4</sup> Número de partículas inicialmente seleccionadas

<sup>5</sup> Número de partículas incluidas en la reconstrucción tridimensional final.

<sup>6</sup> 3DR generada con imágenes digitalizadas en el scanner Zeiss.

<sup>7</sup> 3DR generada con imágenes digitalizadas en el scanner Nikon.

<sup>8</sup> Cálculo de resolución mediante la generación de dos reconstrucciones totalmente independientes.

El centro y las orientaciones iniciales de las partículas de CnVC1, PcV-200 (adquiridas en el Tecnai G<sup>2</sup> FEG 200) y PcV-300 (adquiridas en el Tecnai FEG F30) fueron determinados utilizando como modelo inicial el mapa tridimensional de la cápsida de PcV calculado previamente en el laboratorio (Luque et al., 2010), filtrado a 30 Å de resolución y escalado para cada una de las muestras. Para la DLP de rotavirus se siguió la misma aproximación usando como modelo inicial un modelo tridimensional de la DLP a baja resolución disponible en la página web del laboratorio del Dr. Grigorieff (<http://emlab.rose2.brandeis.edu/rotavirusdlp>). Tanto la búsqueda de orientaciones y orígenes iniciales como el subsiguiente refinamiento angular iterativo fueron realizados mediante métodos de asignación de proyecciones con la rutina *projection matching* integrada en Xmipp (Marabini et al., 1996). Después de cada paso de refinamiento angular iterativo se calcularon 3DRs usando métodos de Fourier-Bessel (Crowther et al., 1970; Fuller et al., 1996) e imponiendo simetría icosaédrica en el mapas de densidad final. Para estimar la resolución de los mapas se calculó la función FSC (*Fourier Shell Correlation*) (van Heel, 1984) entre dos mapas independientes que contienen cada uno la mitad de las

partículas totales empleadas en cada reconstrucción final. La resolución de cada reconstrucción fue determinada como el recíproco de la frecuencia espacial donde el coeficiente de correlación es 0.5 (criterio FSC=0.5), 0.3 (criterio FSC=0.3) ó 0.143 (criterio FSC=0.143) (Rosenthal & Henderson, 2003). El número de partículas incluidas en las 3DRs finales se muestran en la Tabla 3. La resolución de la 3DR de PcV-300 también fue calculada separando las partículas en dos grupos aleatorios equitativamente, y procesando cada uno de ellos de forma totalmente independiente para calcular la FSC entre las 3DR obtenidas al final de cada procesamiento [PcV-300 (Ref. independiente)].

La atenuación de las amplitudes en las altas frecuencias de los mapas de criome fue compensada mediante dos aproximaciones alternativas. (1) Para las imágenes de PcV y CnCV1 adquiridas en el Tecnai G<sup>2</sup> FEG 200 se utilizaron las herramientas de Spider para calcular el perfil de decaimiento de amplitudes de los mapas de criome, y fue ajustado al del mapa de rayos X del virus L-A (número pdb de acceso 1m1c; (Naitow et al., 2002b) filtrado a la resolución de los mapas de criome, ya que se trata de un mapa de similar morfología y tamaño. Dicha función de ajuste fue aplicada a los mapas de criome hasta la máxima resolución calculada. (2) Para las imágenes de rotavirus y PcV-300 se usó el programa Embfactor (Fernandez et al., 2008) para determinar el factor B, o factor de temperatura, que fue aplicado al mapa de criome, ponderado por la curva de la FSC, en el rango de frecuencias desde 15 Å hasta la máxima resolución obtenida. Este factor fue -318 y -232 Å<sup>2</sup> para PcV-300 y la DLP de rotavirus, respectivamente. Para una interpretación completa de las densidades del mapa de PcV-300 fue necesario aplicar factores B alternativos (ver apartado 4.3.2). En ambas aproximaciones, la información correspondiente a las frecuencias espaciales de la máxima resolución efectiva fue eliminada mediante un filtro suave de paso bajo.

El cálculo de densidad radial promedio de los mapas de criome fue realizado con Spider. Los mapas de diferencia fueron calculados mediante sustracción directa de las 3DRs previamente normalizadas y escaladas utilizando dichos promediados radiales.

Las subunidades asimétricas de PcV y CnCV1, así como los cinco trímeros de la capa externa de la DLP de rotavirus, fueron segmentadas mediante el programa UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). De forma general, los límites de las mismas fueron establecidos a partir de la evaluación de las conectividades entre densidades contiguas del mapa a diferentes niveles de umbralización. Para confirmar que la densidad seleccionada corresponde a una sola subunidad asimétrica, evitando solapamientos o pérdidas de densidades, el mapa de la cápsida completa fue totalmente restaurado a partir de la densidad segmentada mediante la aplicación de simetría icosaédrica.

Los cinco tipos de trímeros cuasiequivalentes que forman la cápsida externa de las DLP de rotavirus fueron alineados y promediados entre sí mediante el programa Super (<http://mem.ibs.fr/JORGE/super-64-gfortran.tgz>). Este proceso fue realizado en diferentes rangos de resoluciones siendo el rango óptimo entre 15 Å y 3.6 Å.

### **3.6 Detección y alineamiento de elementos de estructura secundaria**

La determinación y localización de los elementos de estructura secundaria (SSE) en los mapas de criome fue realizada con la herramienta SSEHunter (Baker et al., 2007), que se encuentra integrada dentro del paquete Gorgon (Baker et al., 2011). Este procedimiento analiza el mapa de densidades mediante tres criterios independientes: (1) la generación de una estructura de pseudoátomos, en la que se evalúa la posición y distancia de cada uno de ellos respecto a los situados en su entorno; (2) la construcción de un esqueleto que representa la forma y topología específica del mapa; y (3) la búsqueda de hélices  $\alpha$  mediante la correlación de una hélice  $\alpha$  prototipo con las distintas zonas del mapa de densidad. El conjunto de estas valoraciones queda reflejado en un modelo de pseudo-átomos que es utilizado para la anotación manual de los SSE y la generación de un modelo de hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$  del mapa.

Los modelos de SSE de las mitades A y B de CnCV1 fueron alineados manualmente con el programa UCSF Chimera, tomando como referencia las dos hélices  $\alpha$  más largas de ~25 Å y ~35 Å (en posición tangencial a la superficie de la cápsida), pertenecientes a las mitades A y B, respectivamente. Posteriormente, el ajuste inicial fue refinado mediante pequeñas translaciones y rotaciones para maximizar el número de SSE coincidentes entre ambos modelos. El mismo procedimiento fue seguido para la superposición de los modelos VRML SSE de: (1) CnCV1 A con los SSE conservados de PcV (Luque et al., 2010), (2) CnCV1 B con los SSE conservados de PcV y (3) los SSE conservados de CnCV1 con los SSE conservados de PcV.

### **3.7 Construcción y refinamiento del modelo atómico**

Para el trazado de la cadena peptídica a partir del mapa de criome de PcV-300 se generó un modelo de los SSE de la proteína de la cápsida a partir del mapa de densidad filtrado a 7 Å de resolución según la metodología descrita en el apartado anterior. A partir de este modelo se generó un esqueleto para la cadena polipeptídica mediante dos aproximaciones:

1) Mediante el programa Gorgon, las hélices  $\alpha$  previamente determinadas fueron sustituidas por hélices de C $\alpha$  con geometría ideal. La conectividad entre las hélices sustituidas fue analizada mediante la evaluación del esqueleto del mapa de densidades en conjunto con las posibles correspondencias entre los SSE predichos por secuencia y los determinados para las densidades de criome. Mediante el programa Coot (Emsley et al., 2010) se generó un modelo de

polialaninas a partir del construido con C $\alpha$ .

2) Mediante el programa Coot, los SSE previamente determinados fueron sustituidos por hélices  $\alpha$  y cadenas  $\beta$  de poliAla con geometría ideal mediante herramientas de refinamiento de cuerpo rígido y ajuste manual. Los diferentes fragmentos fueron unidos manualmente mediante la evaluación de la continuidad del mapa de densidades a diferentes niveles de umbralización. Para poder determinar completamente la continuidad de la cadena peptídica (apartado 4.3.2), fue necesario corregir en algunas zonas del mapa la atenuación de las amplitudes con un factor B distinto al determinado como óptimo para el mapa en su conjunto (apartado 3.5)

De forma general, el registro de la secuencia aminoácidos sobre el modelo construido fue realizado manualmente con el programa Coot mediante la asignación de densidades compatibles con cadenas laterales voluminosas a modo de puntos de anclaje de la secuencia. Durante el este proceso de asignación de secuencia fueron determinantes tres regiones: (1) la hélice  $\alpha$ 13 (residuos 380-403), coincidente con la predicción de una hélice  $\alpha$  de 27 residuos (residuos 376-403), (2) el motivo de tres residuos consecutivos con cadenas laterales voluminosas H517-H518-K519 y (3) las hélices consecutivas  $\alpha$ 24,  $\alpha$ 25 y  $\alpha$ 26 (residuos 709-749). La posición de las cadenas principales y las cadenas laterales fue ajustada manualmente.

La escala del mapa de densidades fue refinada utilizando como estándar interno la distancia entre las cadenas  $\beta$  de las diferentes láminas  $\beta$  del modelo. Mediante esta aproximación se determinó que el mapa tridimensional está muestreado a 1.23 Å/píxel, correspondiente a una magnificación calibrada de 56,910x.

Para evaluar la corrección del modelo y mejorar la geometría, ésta fue idealizada mediante el programa Refmac5 (Vagin et al., 2004). La comparación de las estructuras idealizadas y sin idealizar fue utilizada para poner de relieve las regiones a refinar. Asimismo, la geometría del modelo fue revisada de forma iterativa tanto con el programa Procheck (Laskowski et al., 1993) como con las herramientas de validación de Coot. Este proceso nos permitió detectar y corregir la conformación de los aminoácidos situados en regiones no permitidas del mapa de Ramachandran. Una vez finalizada la construcción del modelo, éste fue sometido a 10 ciclos de idealización con el objetivo de asegurar una correcta geometría del mismo.

La bondad del modelo final fue confirmada tanto por inspección visual como por el cálculo con el programa URO (Navaza et al., 2002) de los valores de cros-correlación (CC = 0.824) y factor R (R=39.8) entre el mapa de densidades y las coordenadas.

### 3.8 Análisis del modelo atómico de la CP de PcV.

La superficies de potencial electrostático de la cápsida T=1 de PcV fue calculada con el programa Delphi [[http://wiki.c2b2.columbia.edu/honiglab\\_public/index.php/Software:DelPhi](http://wiki.c2b2.columbia.edu/honiglab_public/index.php/Software:DelPhi), (Rocchia et al., 2002)] y visualizadas con *Chimera*.

Los alineamientos estructurales entre mitades A y B de la proteína de la cápsida de PcV, así como el de éstas con la proteína Gag del virus L-A fue realizado con el programa DALI (Holm & Rosenstrom, 2010). En el alineamiento entre las mitades A y B de PcV se obtuvo un índice de calidad (*z score*) de 13.2 con una desviación cuadrática media (rmsd) de 3.4 Å entre Cα alineados. La comparación estructural de la mitad A de PcV con Gag mostró un *z-score* de 9.2 con una rmsd de 4.4 Å. Estos alineamientos estructurales permitieron definir los SSE compartidos de las proteínas de las cápsidas de PcV (mitades A y B) y L-A.

A partir de la estructura de la proteína de la nucleocápsida de BTV, fue establecida una estructura consenso a todas las proteínas de las nucleocápsida de los reovirus. En primer lugar se alinearon con DALI las estructuras correspondientes a BTV y RDV con un *z-score* de 8.4 (rmsd de 4.4 Å), lo que permitió establecer un núcleo común tras eliminar en el pdb de BTV las regiones no comunes. A continuación se realizó el alineamiento de la estructura consenso de BTV y RDV con la del rotavirus (*z-score* de 8.5 y rmsd de 5.3 Å), y se establece un nuevo núcleo común. Este proceso se repitió iterativamente para todas las estructuras disponibles de los reovirus. El ajuste de la estructura atómica de PcV en el mapa de criome de CnCV1 fue realizado mediante el programa Uro [<http://mem.ibs.fr/JORGE/index.html>, (Navaza et al., 2002)]. La simetría icosaédrica fue asumida en el ajuste considerando el modelo atómico de PcV como un cuerpo rígido independiente o como dos cuerpos rígidos (dominios A y B). Los coeficientes de correlación obtenidos fueron 85.3% y 86.0% para uno o dos cuerpos rígidos, respectivamente.

### 3.9 Números de acceso de las estructuras de criomicroscopía electrónica

Los mapas de densidad calculados para la cápsida llena de CnCV1 y para la cápsida de PcV han sido depositados en la base de datos EMDataBank (*Electron Microscopy Data Bank*, <http://www.emdatabank.org>), con números de acceso EMD-2062 y EMD-5600, respectivamente. Las coordenadas atómicas de la proteína de la cápsida de PcV han sido depositadas en la base de datos del PDB (*Protein Data Bank*) el número de acceso 3J3I.

## ***4. Resultados***





## **4.1 Estructura del virus CnCV1**

### **4.1.1 Estructura tridimensional del virus CnCV1**

Con el fin de determinar si la arquitectura de la cápsida de PcV, así como el plegamiento de su CP, es una característica común dentro de los chrysovirus, se decidió caracterizar estructuralmente a otro miembro de la familia. Con este objetivo, se purificaron viriones del chrysovirus CnCV1 mediante ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa. La homogeneidad e integridad estructural de las partículas purificadas fue inicialmente caracterizada mediante microscopía electrónica de las muestras teñidas negativamente y, posteriormente, éstas fueron vitrificadas y analizadas mediante criome. La visualización directa de imágenes de criome muestra una población homogénea de partículas isométricas que poseen una morfología circular (Fig. 9A). Mediante el procesamiento digital de imágenes y 3DR, se generó un mapa de densidad de la cápsida de CnCV1 que fue calculado a partir de 16,859 imágenes con una resolución de de 8.1 Å y 6.8 Å, en base a los criterios de FSC 0.5 y 0.3, respectivamente (Fig. 9B).

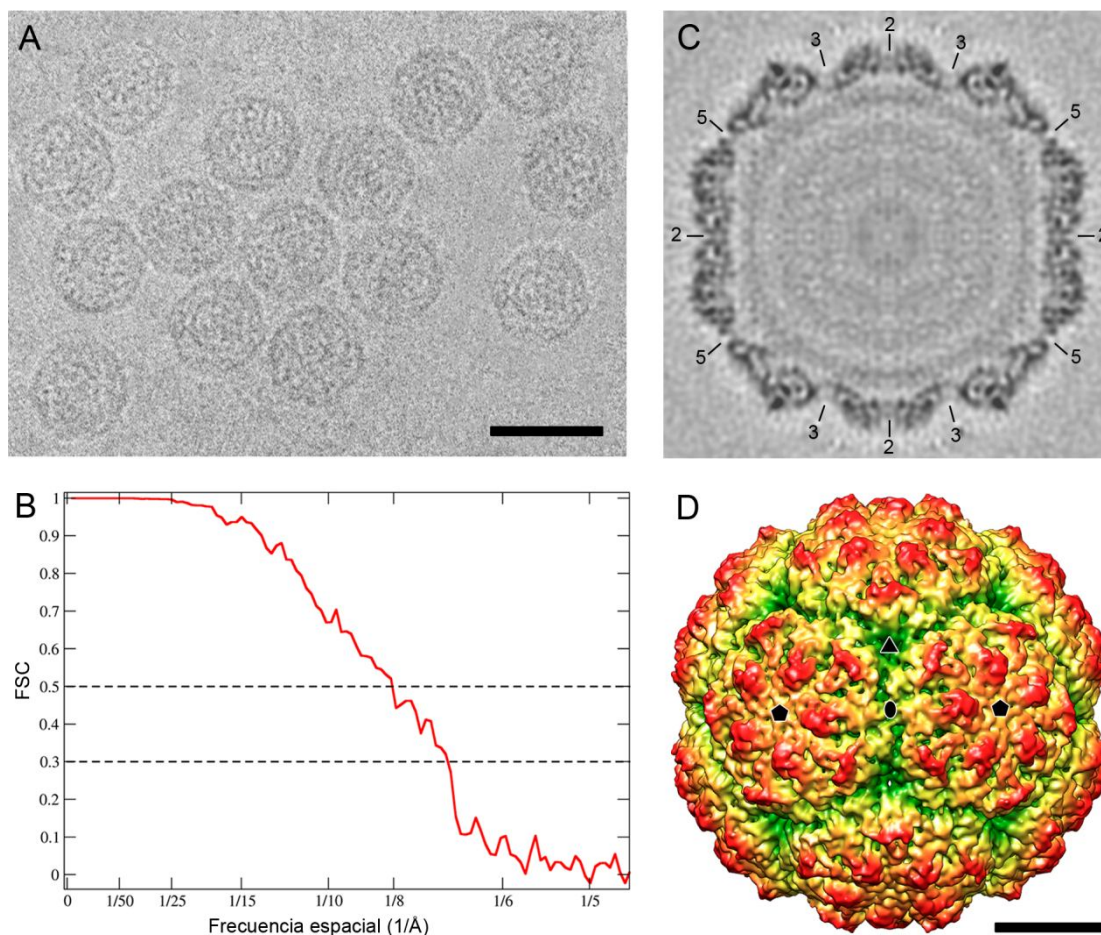
La arquitectura molecular de la cápsida de CnCV1 es similar a la descrita previamente para PcV (Luque et al., 2010). El mapa de superficie de la 3DR de la cápsida presenta un aspecto corrugado y posee un diámetro promedio exterior de 400 Å e interior de 310 Å. Su grosor es de ~48 Å en su punto más ancho y de ~8 Å en su punto más estrecho, localizado en la zona de los ejes de simetría de orden tres. La característica más destacable de la arquitectura de la cápsida es la presencia de 12 pentámeros protuberantes que delimitan profundas cavidades en las zonas inter-pentaméricas (Fig. 9C y D), donde se localizan los ejes de simetría de orden dos y tres.

### **4.1.2 Estequiometría del virus CnCV1**

Para obtener una estimación independiente del número de copias de la CP presentes en el virión de CnCV1, las partículas purificadas fueron analizadas mediante ultracentrifugación analítica (Fig. 10A). La distribución de coeficientes de sedimentación obtenida muestra que las partículas sedimentan como una única especie bien definida con un coeficiente estándar de sedimentación corregido ( $s_0$ ) de 135S. Dicho coeficiente es únicamente compatible con el correspondiente a una cápsida con una arquitectura T=1 (Fig. 10B), constituida por 60 copias de la CP. El coeficiente de fricción calculado fue de  $1.3 \pm 0.05$ , valor similar al previamente obtenido para la partícula de PcV (Caston et al., 2003).

Una vez determinado el número de copias de la CP presentes en el virión, los límites de la misma fueron establecidos a partir de la evaluación de las conectividades del mapa a

diferentes niveles de umbralización. Para confirmar que la densidad segmentada corresponde únicamente a una subunidad asimétrica, el mapa completo de la cápsida fue restaurado mediante la aplicación de simetría icosaédrica a la densidad seleccionada. La subunidad asimétrica de la cápsida de CnCV1 presenta una forma romboide con unas dimensiones de 110 Å de ancho y 130 Å de largo (Fig. 10B).

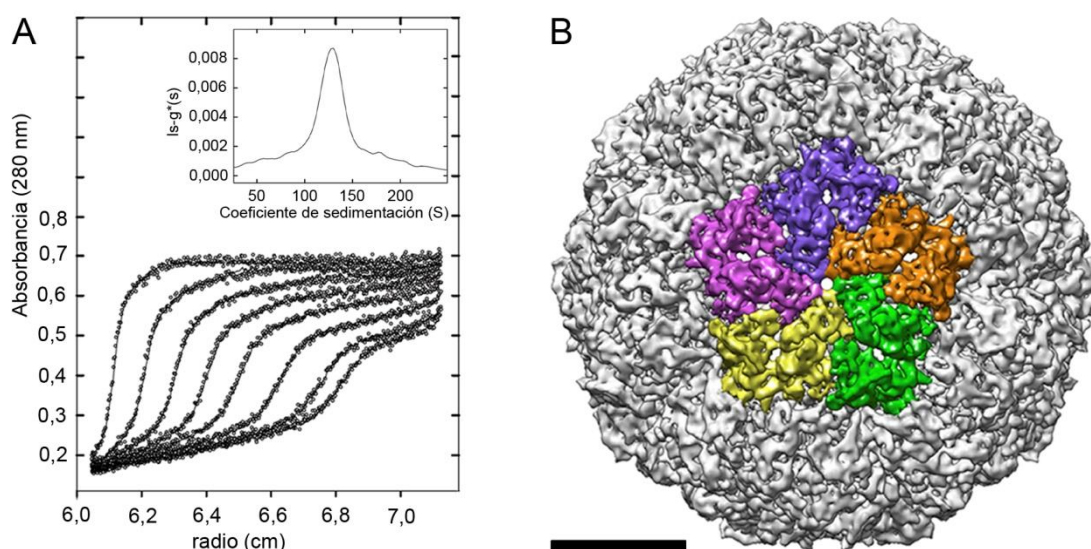


**Figura 9. CrioME de los viriones de CnCV1.** (A) Criomicrografía electrónica de cápsidas virales de CnCV1. La barra de escala corresponde a 200 Å. (B) Determinación de la resolución de la 3DR mediante FSC. Las líneas discontinuas negras representan umbrales de FSC iguales a 0.5 y 0.3 para los cuales se obtienen resoluciones de 8.1 y 6.8 Å, respectivamente. (C) Sección central del mapa de densidades de la partícula de de CnCV1, vista desde el eje de simetría de orden 2. Las líneas negras indican los ejes de simetría de orden (2, 3 o 5) indicado. (D) Estructura tridimensional de la cápsida de CnCV1 vista desde un eje de simetría de orden dos. La superficie se muestra coloreada radialmente de verde a rojo, de radio interno a externo respectivamente, y umbralizada a  $2\sigma$  sobre la densidad media. La barra de escala corresponde a 100 Å.

#### 4.1.3 Duplicación estructural de la CP de CnCV1

Siguiendo la misma aproximación descrita en el apartado anterior, la CP de CnCV1 fue evaluada a diferentes niveles de umbralización y se observó que está formada por dos mitades denominadas A y B (Fig. 11, coloreadas en violeta y verde, respectivamente). Ambas mitades

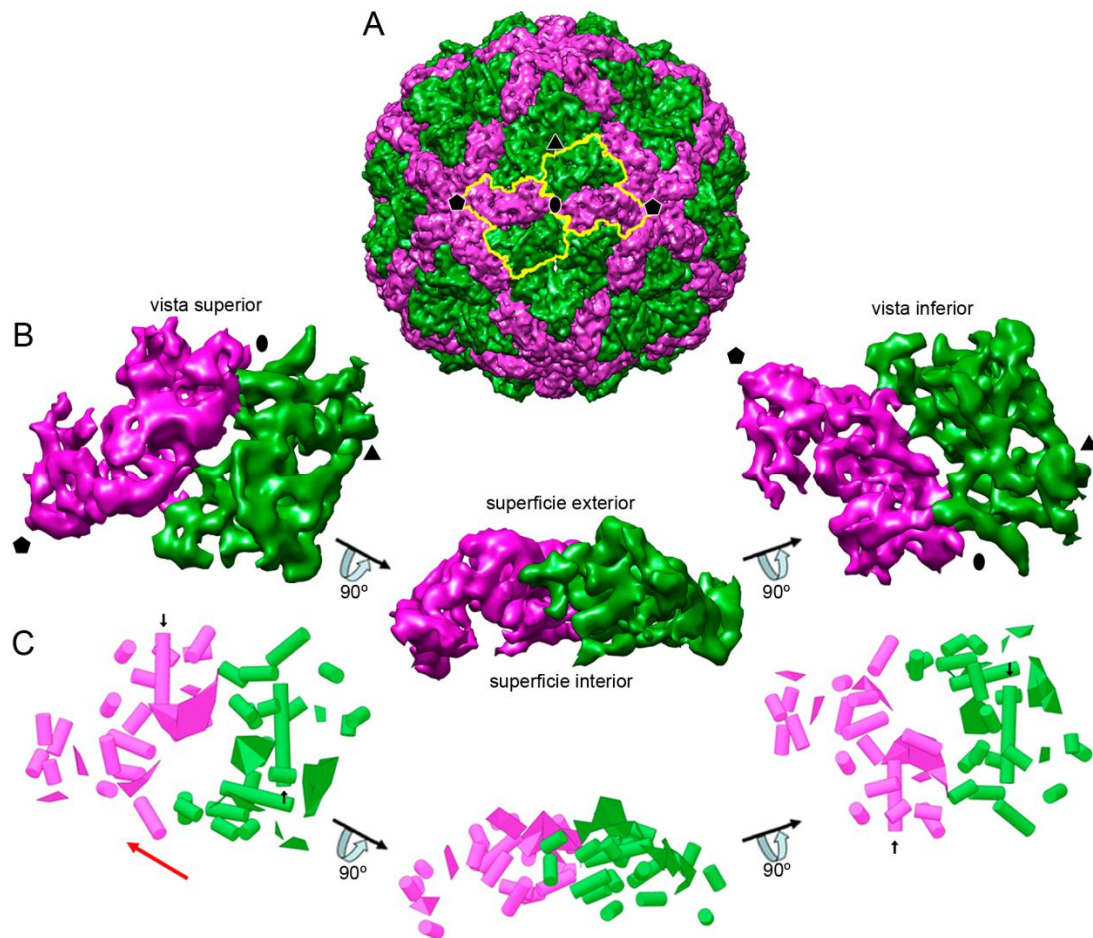
tienen una apariencia elipsoidal y poseen una morfología similar. La mitad A da cuenta del 48% del volumen de la subunidad asimétrica mientras que la mitad B ocupa el 52% restante (Fig. 11B). En el contexto de la cápsida, ambas mitades forman un pseudodecámero alternándose alrededor del eje de simetría de orden cinco, con cinco mitades A en contacto directo con el eje y cinco mitades B intercaladas entre las anteriores en una posición más distal al mismo (Fig. 11A). Esta organización cuaternaria es similar a la observada en PcV, así como en las cápsidas de reovirus y los totivirus, formadas por 120 subunidades con un número de triangulación  $T=1$  (Fig 4).



**Figura 10. Estequiometría de los viriones de CnCV1.** (A) Análisis mediante ultracentrifugación analítica de los viriones de CnCV1. Los puntos muestran los perfiles de velocidad de sedimentación de las partículas a diferentes tiempos. Las líneas continuas corresponden al mejor ajuste de la distribución de  $ls-g^*(s)$ . En el recuadro se muestra la distribución del coeficiente de sedimentación. (B) Superficie del virión de CnCV1 visto desde el eje de simetría de orden cinco. Se muestran, en diferentes colores, cinco subunidades de la CP segmentadas. La barra de escala corresponde a 100 Å.

La resolución obtenida en el mapa de criome permite definir numerosas densidades con una morfología tubular o laminar (Fig. 11B) que deben corresponderse con elementos de estructura secundaria (SSE) (Chiu et al., 2005). Estas densidades fueron caracterizadas mediante la identificación computacional de SSE con el programa SSEHunter (Baker et al., 2007). Dicho programa evalúa las densidades del mapa y genera un modelo de SSE según la probabilidad de pertenencia a hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$  de las mismas. La predicción de SSE en la subunidad asimétrica de la cápsida de CnCV1 indica que es una estructura rica en hélices  $\alpha$  (Fig. 11C), donde fueron identificadas 38 hélices  $\alpha$  y 12 láminas  $\beta$ . La mitad A posee 18 hélices  $\alpha$  y 6 láminas  $\beta$  y la mitad B 20 hélices  $\alpha$  y 6 láminas  $\beta$ . Además, al igual que ha sido previamente descrito para la CP de PcV, cada una de las mitades de la subunidad asimétrica posee una

hélice  $\alpha$  de mayor tamaño ( $\sim 25\text{\AA}$ , para la mitad A y  $\sim 35\text{\AA}$ , para la mitad B) que se encuentra tangencial a la superficie de la cápsida (Fig. 11C, indicado con flechas).



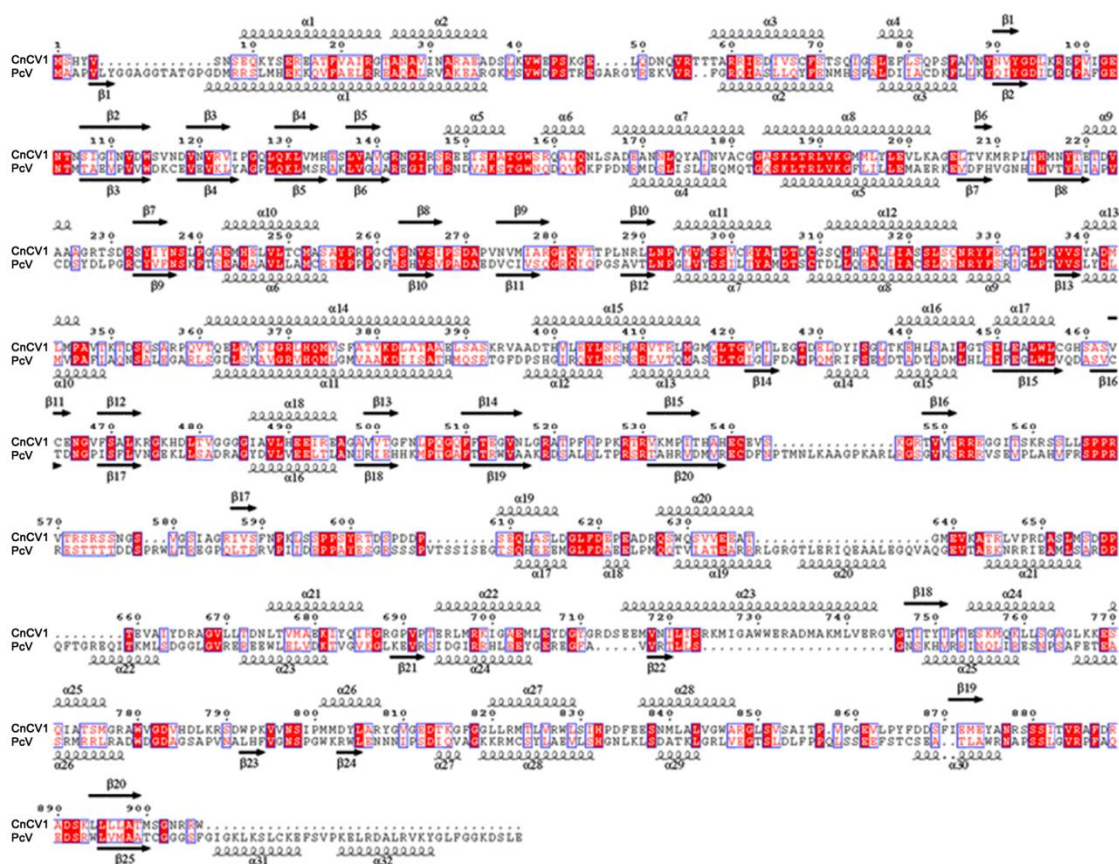
**Figura 11. Estructura de la cápsida T=1 de CnCV1 y modelo del plegamiento de su proteína de la cápsida (CP).** (A) 3DR de la cápsida vista desde el eje de simetría de orden dos representando la disposición espacial de las dos mitades, A (violeta) y B (verde), que componen la CP. Los límites de dos subunidades asimétricas están señalados en amarillo. (B) Subunidad asimétrica segmentada (monómero de la CP). Las figuras geométricas indican la posición de los ejes de simetría. (C) SSE predichos a partir del mapa de densidad de la subunidad asimétrica. Los cilindros representan probables hélices  $\alpha$  y las superficies planares a láminas  $\beta$  probables. Las flechas negras indican las hélices  $\alpha$  de 25 y 35  $\text{\AA}$  identificadas en las mitades A y B, respectivamente. La flecha roja indica la dirección del movimiento para la superposición de la mitad B en A.

#### 4.1.4 Análisis de las secuencias de las CP de CnCV1 y PcV

En trabajos anteriores, el análisis de secuencia de la CP de PcV mostró un cierto grado de similitud entre las mitades amino y carboxilo de la CP de PcV (Caston et al., 2003). Siguiendo esta misma aproximación, la secuencia de la CP de CnCV1 fue analizada mediante herramientas bioinformáticas y no fue detectada conservación de secuencia entre las regiones equivalentes de la CP de CnCV1. Sin embargo, el alineamiento de las secuencias de la CP de CnCV1 (906 residuos) y la de PcV (982 residuos) reveló una identidad del 25 % y una



similitud del 40 % entre ambas (Fig. 12). Esta conservación de secuencia no está homogéneamente distribuida en toda la subunidad, sino que es mayor en la región N-terminal de ambas secuencias (30 % de identidad y 45 % de similitud) que en la C-terminal (20 % de identidad y 35% de similitud).



**Figura 12. Alineamiento de secuencia y predicción consenso de SSE de las CP de CnCV1 y PcV.** Se representa la predicción consenso de SSE, obtenida por mayoría simple a partir de varios métodos de predicción de SSE (PsiPred, Jnet, Porter, Sable, Gor, Yaspin y Profsec) para cada posición de la secuencia. Los residuos idénticos están resaltados en blanco con fondo rojo, y los residuos equivalentes están representados en rojo. Las flechas representan cadenas β y las espirales hélices α

Los SSE de las CP de CnCV1 y PcV fueron predichos a partir de sus secuencias por consenso de varios métodos de predicción de estructura (PsiPred, Jnet, Porter, Sable, Gor, Yaspin y Profsec) (Adamczak et al., 2004; Cuff & Barton, 2000; Jones, 1999; Lin et al., 2005; Pollastri & McLysaght, 2005; Sen et al., 2005). Este análisis muestra que ambas CP poseen un alto contenido de hélices α compatible con el modelo de SSE obtenido a partir de la densidad de criome. La mayoría los SSE predichos presentan un buen grado de alineamiento entre las CP de ambos chrysovirus que, en concordancia con el alineamiento de secuencias, es mayor en la región N-terminal. En la secuencia de PcV se predice una zona desestructurada, entre los residuos 550-650, que divide en dos mitades a la proteína (Luque et al., 2010). El análisis de la secuencia de la CP de CnCV1, además de generar una predicción de SSE compatible con el

modelo de plegamiento de SSEHunter, también predice la existencia de una región desestructurada (residuos 550-610) que, además, alinea con la predicha para PcV.

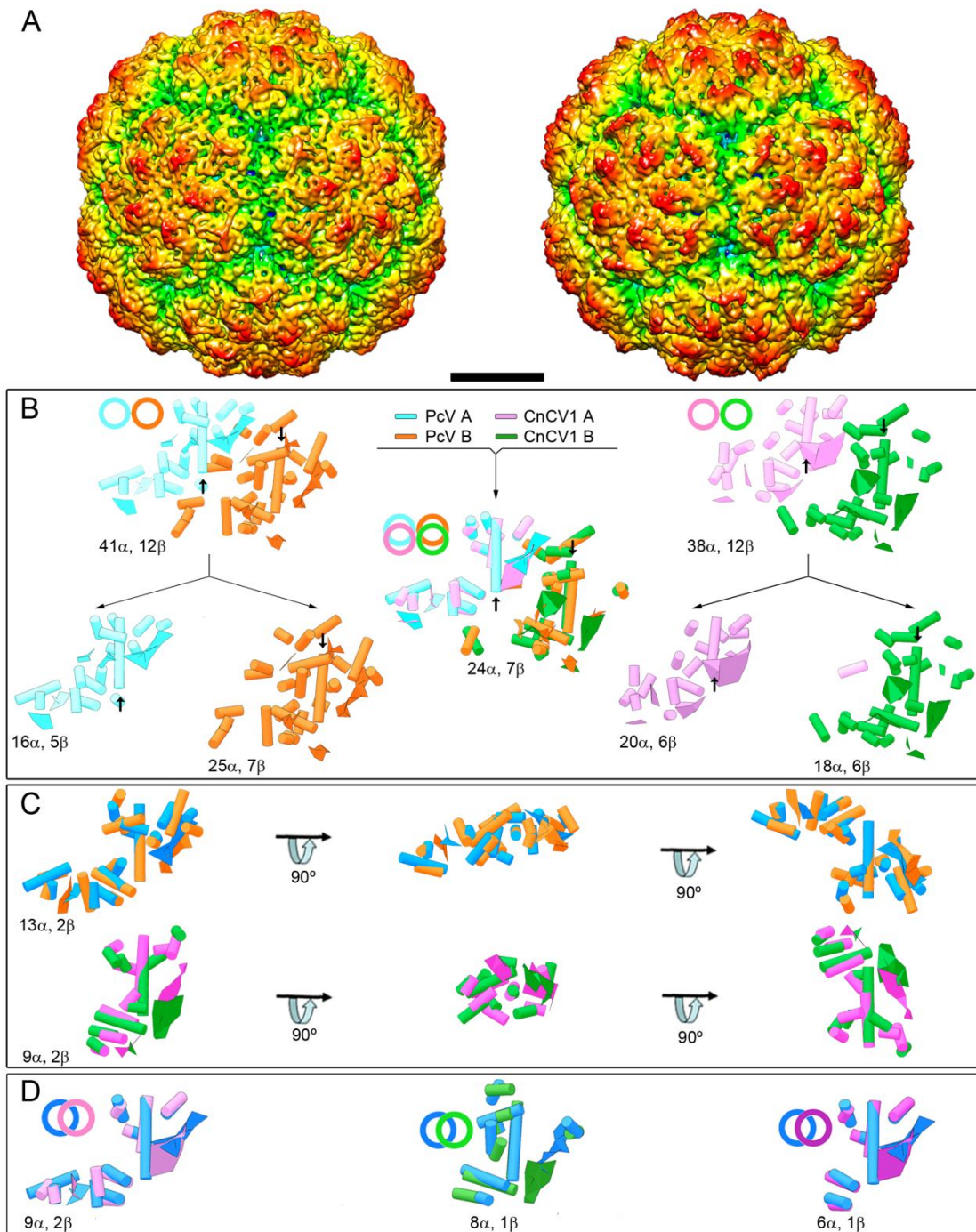
Aunque el análisis de las secuencias de las CP de CnCV1 y PcV muestra un cierto grado de homología tanto entre sus secuencias como en los SSE predichos a partir de las mismas, estos no datos no son conclusivos y se hace necesario establecer comparaciones estructurales para una mejor comprensión de las relaciones entre estos chrysovirus.

#### **4.1.5 Comparación de las estructuras secundarias y terciarias de las CP de CnCV1 y PcV**

Las comparaciones entre estructuras secundarias y terciarias de diferentes CP son usualmente utilizadas para establecer relaciones entre ellas, cuando no existen similitudes en la secuencia (Baker et al., 2005; Smyth & Martin, 2000). La 3DRs obtenidas a partir de imágenes de CrioME de viriones de PcV y CnCV1 muestran que ambas cápsidas comparten un tamaño y arquitectura general común (Fig. 13A). Con el fin de realizar una comparación estructural más detallada entre ambas estructuras, los SSE determinados a partir de los mapas de densidades de las CP de PcV y CnCV1 fueron alineados. El solapamiento espacial entre ambas estructuras muestra la superposición de 24 hélices  $\alpha$  y 7 láminas  $\beta$ , lo que representa una superposición del 62% de los SSE (Fig. 13B centro). Este resultado indica una gran semejanza en el plegamiento general de las CP de ambos virus y sugiere la presencia de una estructura terciaria común en ambas proteínas.

Para analizar la presencia de un plegamiento común en ambas mitades de la CP de CnCV1 se llevó a cabo la misma aproximación previamente realizada con PcV (Luque et al., 2010). Así, ambos dominios fueron superpuestos mediante la traslación de una de las mitades hasta hacer coincidir las dos largas hélices  $\alpha$  de ambos dominios previamente descritas (Fig. 13B flechas). Este análisis muestra que mientras que PcV presenta 13 hélices  $\alpha$  y 2 láminas  $\beta$  coincidentes entre ambas mitades de la CP, CnCV1 posee 9 hélices  $\alpha$  y 2 láminas  $\beta$  comunes (Fig. 13C) y, constituyen núcleos de plegamiento conservados en ambas CP.

La disposición espacial de los SSE del núcleo común a ambas mitades de la CP de PcV fue comparada con la de cada una de las mitades de la CP CnCV1 (Fig 13D). La mitad A presenta 9 hélices  $\alpha$  y 2 láminas  $\beta$  comunes (Fig. 13D izquierda) y la mitad B 8 hélices  $\alpha$  y 1 lámina  $\beta$  (Fig. 13D centro). Finalmente, la superposición de los SSE comunes a ambas dominios de las CP de PcV y CnCV1 muestran 6 hélices  $\alpha$  y 1 lámina  $\beta$  comunes (Fig. 13D derecha) se superponen. Estos resultados no sólo indican la presencia un plegamiento común a las CP de los crysovirus PcV y CnCV1, sino que, en ambos casos, aparece un motivo de plegamiento conservado en las mitades N-terminal y C-terminal de la proteína.



**Figura 13. Comparación estructural entre las CP de PcV y CnCV1.** (A) Superficie de las cápsidas de PcV (izquierda) y CnCV1 (derecha) coloreadas radialmente y vistas desde el eje de simetría de orden 2. Los mapas se muestran umbralizados a  $2\sigma$  sobre la densidad media. (B) Superposición de los SSE de PcV (izquierda, mitad A en azul y mitad B en naranja) y los SSE de CnCV1 (derecha, mitad A en violeta y mitad B en verde). Están indicados los elementos comunes de la superposición de los SSE de PcV y CnCV1 (centro, 24 hélices  $\alpha$  y 7 láminas  $\beta$ ). Las flechas indican las hélices  $\alpha$  largas en cada mitad de cada subunidad de PcV y CnCV1. Las circunferencias para cada modelo (arriba) indican las superposiciones estructurales realizadas. (C) Superposición de los SSE conservados entre mitades de PcV (arriba, mitad A en azul y mitad B en naranja) y CnCV1 (abajo, mitad A en violeta y mitad B en verde). Se muestran los elementos comunes de la superposición de ambas mitades de PcV (arriba, 13 hélices  $\alpha$  y 2 láminas  $\beta$ ) y CnCV1 (abajo, 9 hélices  $\alpha$  y 2 láminas  $\beta$ ). (D) Superposición de los SSE conservados entre ambas mitades de la CP de PcV (azul) con los SSE del dominio A de de CnCV1 (rosa claro), con los SSE del dominio B de CnCV1 (verde), y los SSE conservados entre ambas mitades de CnCV1 (violeta).

#### **4.1.6 Análisis del dsRNA del virus CnCV1**

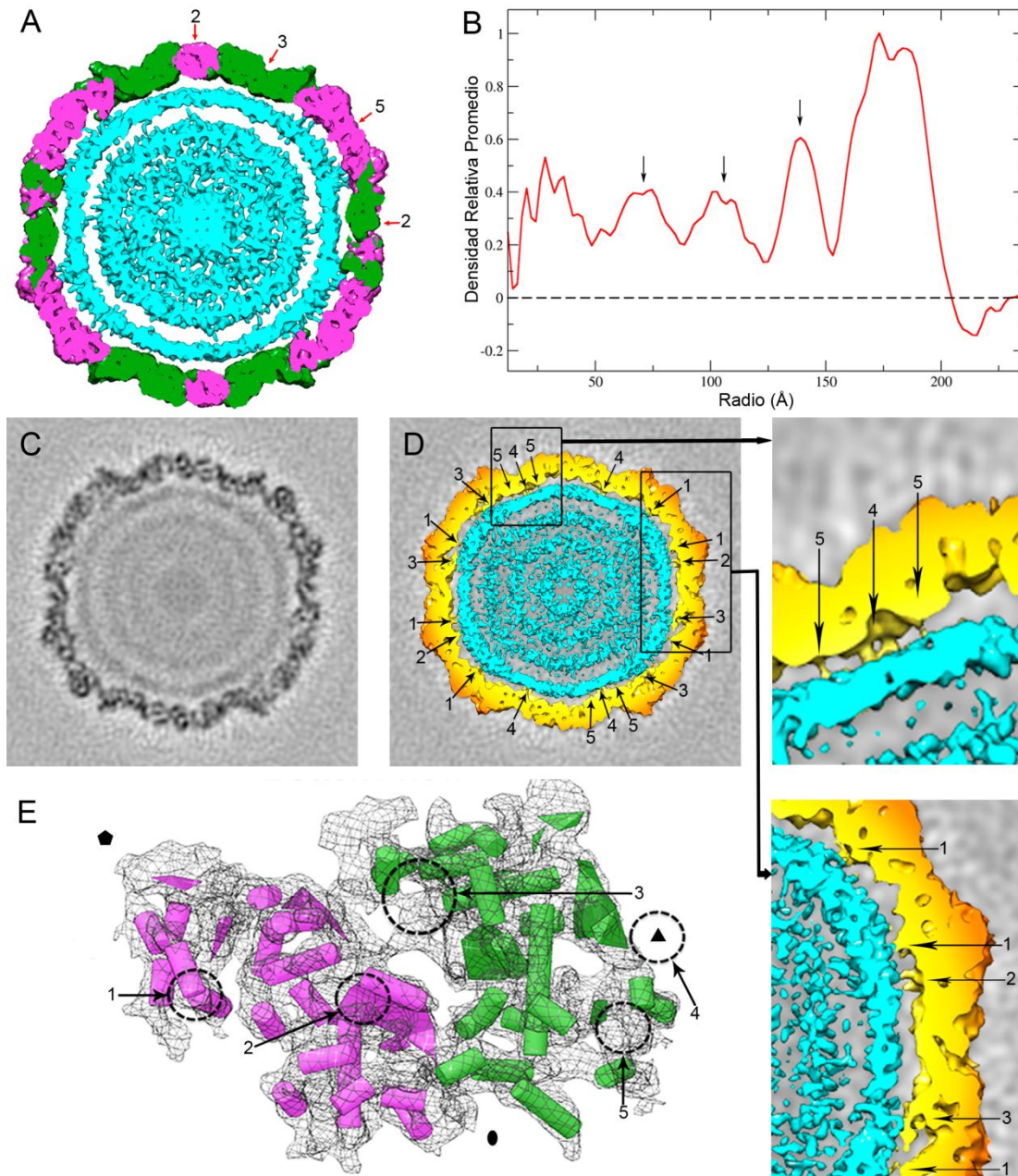
La organización del RNA empaquetado en el interior de la partícula fue caracterizada, a una relativamente baja resolución, mediante el análisis de la densidad de criome. El análisis de la partícula muestra que la cápsida proteica está en estrecho contacto con la densidad subyacente, atribuida al dsRNA encapsidado en el virión (Fig. 14). El análisis del promediado radial del mapa de CnCV1 indica que, como resultado de estas interacciones, prácticamente no hay espacio entre la cápsida y la primera capa de RNA (Fig 14B, flechas negras, máximo a un radio de 140 Å), siendo su distancia promedio de 11 Å. Aunque es posible distinguir máximos de densidad en radios más internos de la cápsida (Fig 14B, flechas negras, máximos a radios de 70 y 105 Å), estas capas de RNA aparecen más difusas y con una densidad menor que la de la capa en contacto directo con la cápsida. Este hecho viene derivado de la presencia de numerosas interacciones entre la CP y el genoma en esta primera capa de dsRNA (Fig. 14C y D), que son mantenidas en la 3DR tras la imposición de simetría icosaédrica, y sugieren un menor grado de ordenamiento en las capas más internas. Existen en total 260 zonas diferenciadas de interacción entre la cápsida y la capa exterior de RNA. La identificación de estos puntos de interacción en la CP muestra que ésta interacciona en cinco zonas distintas con el dsRNA (Fig. 14E, numeradas 1-5). Estas zonas se corresponde con 4 puntos de interacción únicos por CP (zonas 1, 2, 3 y 5) y un punto de interacción (zona 4), localizado en el eje de simetría de orden 3, que es compartido con otras 2 subunidades (Fig. 14E).

### **4.2 Criomicroscopía electrónica de virus icosaédricos a resolución cuasi-atómica**

#### **4.2.1 Criome de PcV obtenida en el microscopio Tecnai G<sup>2</sup> FEG 200 kV**

Los resultados obtenidos en el apartado anterior indican la presencia de un plegamiento común entre ambas mitades de la CP de los chrysovirus PcV y CnV. Estudios previos llevados a cabo en el laboratorio sugieren que dicho plegamiento podría ser un motivo compartido por otros virus dsRNA, como el virus L-A (Luque et al., 2010). Por lo tanto, la caracterización de la estructura de la CP de chrysovirus a la mayor resolución posible podría constituir una herramienta clave para definir las relaciones evolutivas entre diferentes virus dsRNA y la compresión de la arquitectura de su nucleocápsida. La resolución de la CP de PcV a nivel atómico a partir de imágenes de criome cumpliría este objetivo y, adicionalmente, serviría como plataforma para puesta a punto de esta metodología en el laboratorio y, por primera vez, en el país.





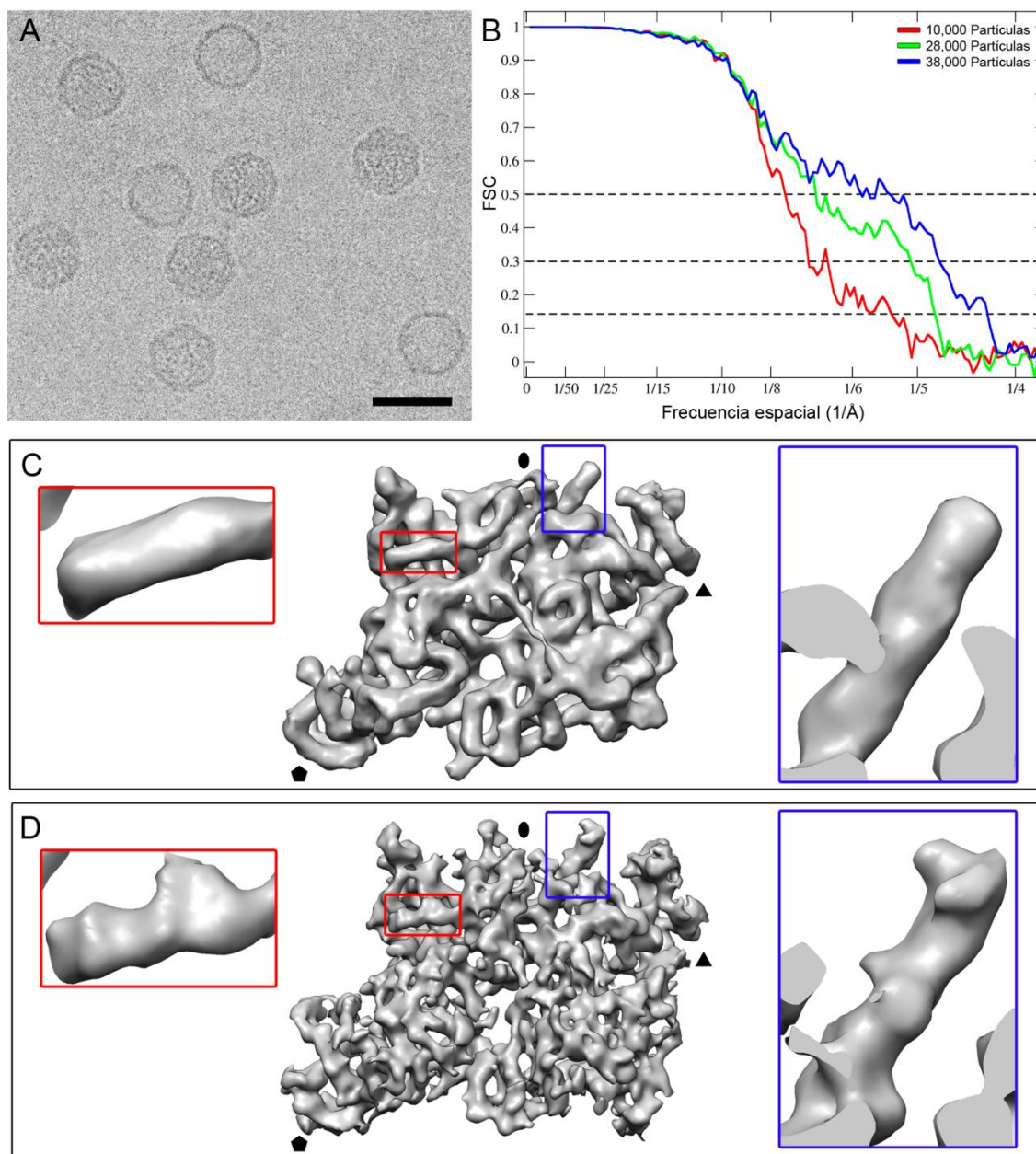
**Figura 14. RNA genómico en el interior de CnCV1.** (A) Sección de la cápsida de CnCV1 de 30Å de grosor. Las mitades A y B de la CP se muestran coloreadas en violeta y verde, respectivamente. El RNA y los contactos están coloreados de azul claro. El mapa se muestra umbralizado a  $1.2\sigma$  sobre la densidad media para destacar las zonas de contacto con el RNA. (B) Perfil de densidad radial del mapa de CnCV1. Las flechas indican máximos de densidad en radios 70, 105 y 140 Å. (C) Sección transversal de 2 Å de grosor y desplazada 11 Å de la sección central vista desde el eje de simetría de orden 2. (D) Sección transversal igual que en (C), pero mostrando el mapa umbralizado a  $1.2\sigma$  sobre la densidad media. El RNA se encuentra coloreado en azul claro. Se indican los 5 tipos de interacciones existentes entre la cápsida y el RNA. Los cuadros adyacentes muestran 2 regiones magnificadas. (E) Subunidad asimétrica de CnCV1, umbralizado a  $2.5\sigma$ , y representada como una malla en la que se superpone los SSE determinados previamente. El dominio A está en violeta y el dominio B en verde. Los círculos en líneas discontinuas representan las zonas en interacción de la cara interna de la subunidad y el RNA (1 a 5). Las figuras geométricas en negro representan la posición de los ejes de simetría.

En este contexto, se decidió ampliar el conjunto de datos previamente empleados en el laboratorio para obtener la reconstrucción a resolución subnanométrica de la cápsida de PcV (Luque et al., 2010). Este conjunto había sido originalmente adquirido en un microscopio FEI Tecnai G<sup>2</sup> FEG 200 kV y consta de ~10,000 imágenes de partículas de PcV. Mediante procesamiento digital de estas imágenes y reconstrucción 3DR, se calculó un mapa de densidades con una resolución de 7.6 Å, 6.9 Å y 5.5 Å, en base a los criterios de FSC 0.5, 0.3 y 0.143, respectivamente (Fig. 15B, curva roja). Este resultado es equivalente al obtenido previamente.

Para ampliar el conjunto de datos, se purificaron viriones de PcV mediante ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa y fueron analizados mediante CrioME en el microscopio Tecnai G<sup>2</sup> FEG 200 kV en condiciones equivalentes a las empleadas anteriormente (Fig. 15A). En un primer momento se amplió el conjunto de datos mediante la adición de ~18,000 nuevas imágenes que, una vez escaladas adecuadamente, fueron procesadas junto con las ~10,000 imágenes originales para obtener una 3DR a partir de las ~28,000 partículas resultantes. El mapa calculado presenta una resolución de 6.5 Å, 5.0 Å y 4.6 Å en base a los criterios de FSC 0.5, 0.3 y 0.143, respectivamente (Fig. 15B, verde). Dado el incremento de resolución obtenido, se adquirieron y añadieron ~10,000 nuevas imágenes al conjunto de datos anterior y se calculó una nueva 3DR de las ~38,000 partículas totales con una resolución de 5.9 Å, 4.7 Å y 4.2 Å para valores de FSC de 0.5, 0.3 y 0.143, respectivamente (Fig. 4.7B, azul). El análisis de las curvas de resolución obtenidas muestra que la incorporación de nuevas partículas al conjunto de datos inicial produce un claro incremento de los valores de FSC en frecuencias espaciales altas (~8-4 Å), que no es correspondido a medias y bajas frecuencia (menores de 8 Å).

La comparación visual de los mapas densidades obtenidos para las reconstrucciones que incluyen ~10,000 y ~38,000 partículas (Fig. 15C y D), muestra un cierto incremento en el nivel de detalle observado en la 3DR que se hace puntualmente patente en la visualización directa de los surcos correspondientes al paso de rosca de la hélices  $\alpha$  (Fig. 15C y D, recuadros rojo y azul). Sin embargo, y en contraste con la resolución determinada por FSC, no es posible detectar detalles estructurales de mayor resolución como las densidades de los lazos, la separación de las cadenas que forman cada hoja  $\beta$  o la presencia de densidades correspondientes a las cadenas laterales de residuos voluminosos. Este hecho indica una sobrestimación de la resolución de las 3DR obtenidas y sugiere la presencia de factores limitantes para la obtención de una 3DR con resolución cuasi-atómica a partir de imágenes de crioME según la aproximación empleada. Estos factores limitantes podrían derivar de: (1) la propia muestra biológica, (2) los instrumentos empleados para la adquisición (microscopio

Tecnai FEG 200 kV) y digitalización (escáner Nikon Super CoolScan 9000 ED) de las imágenes y (3) la metodología de procesamiento digital empleada. Aunque es difícil evaluar la idoneidad de una muestra para su análisis a alta resolución, la rigidez y regularidad de un virus icosaédrico, como



**Figura 15. Criome de PcV del microscopio Tecnai G<sup>2</sup> FEG 200 kV.** (A) Criomicrografía electrónica de cápsidas virales de PcV adquiridas en el microscopio Tecnai FEG 200 kV. La barra de escala corresponde a 500 Å. (B) Determinación de la resolución de la 3DR mediante FSC. Las líneas discontinuas negras representan umbrales de FSC iguales a 0.5, 0.3 y 0.143 para los cuales se obtienen resoluciones de (7.6 Å, 6.9 Å y 5.5 Å), (6.5 Å, 5.0 Å y 4.6 Å) y (5.9 Å, 4.7 Å y 4.2 Å) para 3DRs con 10,000, 28,000 y 38,000 partículas respectivamente. (C) Subunidad asimétrica de segmentada a partir de la 3DR de la cápsida de PcV con ~10,000 partículas y (D) ~38,000 partículas. Los recuadros rojo y azul remarcen densidades correspondientes a hélices alfa que muestran ampliadas en los paneles del color correspondiente.

PcV, lo hace a priori apropiado para este tipo de análisis. Por otra parte, la obtención de 3DR de alta resolución por parte de otros grupos hace disponibles: (1) conjuntos de datos ya reconstruidos a alta resolución y, por tanto, ideales para la evaluación de la metodología de procesamiento; y (2) instrumentos donde ya se han adquirido y digitalizado imágenes que han resultado óptimas para su 3DR a alta resolución.

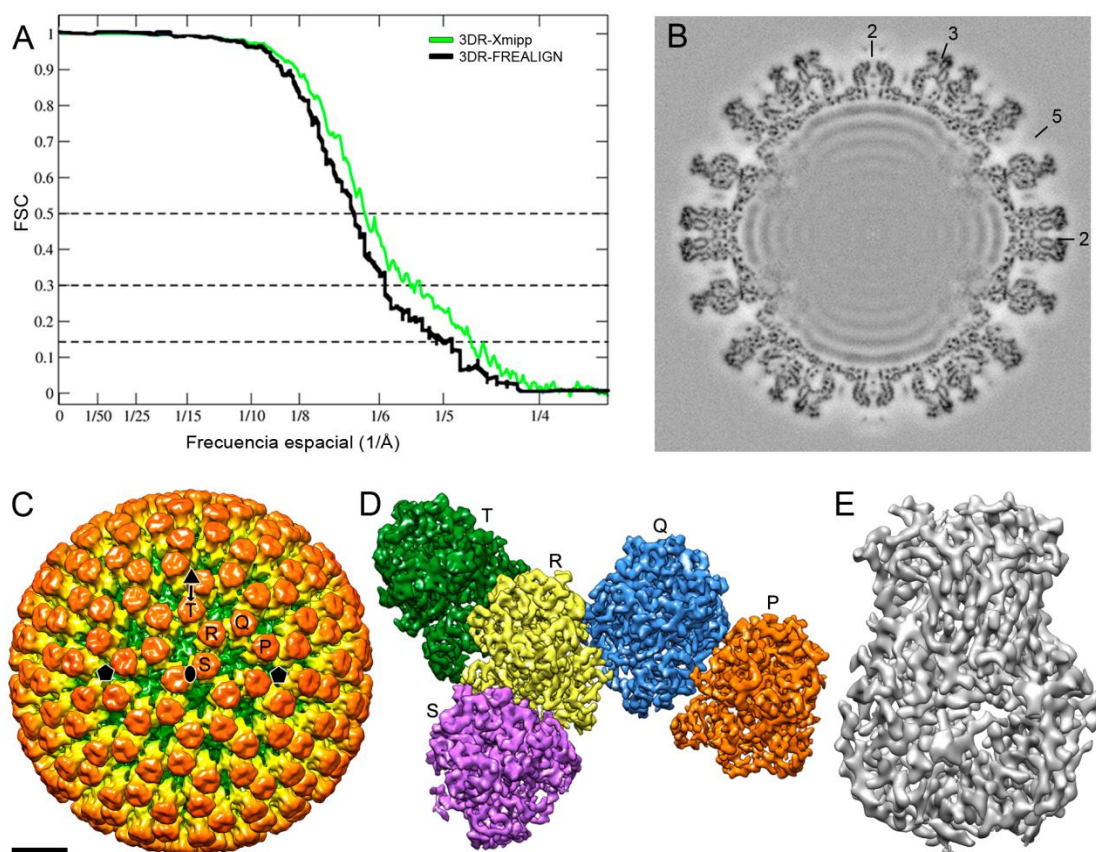
#### **4.2.2 CrioME de rotavirus obtenida en el microscopio Tecnai F30 FEG 300 kV**

En el momento de comenzar este trabajo, los paquetes de software que habían sido utilizados para obtener reconstrucciones 3D de virus icosaédricos a resolución cuasi-atómica eran EMAN (Ludtke et al., 1999), Frealign (Grigorieff, 2007) y/o IMIRS (Liang et al., 2002; Zhou & Chiu, 2003) (Introducción, Tabla 2). La metodología de procesamiento empleada en los apartados anteriores (3DR de CnV y PcV-200) se basa en la asignación de proyecciones con el paquete Xmipp (Marabini et al., 1996). Para determinar si esta metodología es válida para la obtención de una 3DR a resolución cuasi atómica se decidió emplear como control las imágenes de las partículas de doble capa (DLP) de rotavirus previamente utilizadas por el grupo del Dr. Nikolaus Grigorieff para obtener una 3DR a 4.1 Å de resolución (Zhang et al., 2008). Este conjunto de datos está constituido por 18,125 imágenes de DLP de rotavirus originalmente registradas con un microscopio Tecnai G<sup>2</sup> F30 FEG operado a 300 kV en micrografías posteriormente digitalizadas con un escáner Zeiss Photoscn TD. Mediante la rutina *Projection Matching* integrada en Xmipp (detallado en apartado 3.5 de Materiales y Métodos) se calculó un mapa de densidades de la DLP de rotavirus con una resolución estimada de 6.3 Å, 5.4 Å y 4.7 Å en base los criterios FSC 0.5, 0.3 y 0.143, respectivamente (Fig. 16A-C). La comparación directa entre las curvas de FSC de la 3DR publicada obtenida previamente por el grupo del Dr. Grigorieff con Frealign (Fig. 16A, negro) y la obtenida con Xmipp (Fig. 16A, verde) muestra un comportamiento similar, siendo los valores de FSC de esta última ligeramente superiores en todas las frecuencias espaciales entre 9 y 4 Å.

La DLP de rotavirus está formada por una cápsida interna de 60 dímeros de la proteína VP2 con simetría icosaédrica T=1 y una segunda capa proteica de 780 copias de la proteína viral VP6 con arquitectura icosaédrica T=13 (Chen et al., 2009). Los 13 monómeros cuasiequivalentes de VP6 están organizados en 260 capsómeros triméricos que se disponen en cinco entornos locales diferentes (Fig. 16C y D, rotulados P-T). Los monómeros constituyentes de estos trímeros no se encuentran en posiciones equivalentes y, por lo tanto, no son promediados en la reconstrucción con simetría icosaédrica. Sin embargo, la alta homología estructural entre las diferentes conformaciones de los monómeros cuasi-equivalentes, permite el promediado de las densidades electrónicas de los mismos y la consiguiente mejora en la resolución del mapa calculado. Esta aproximación fue llevada por el



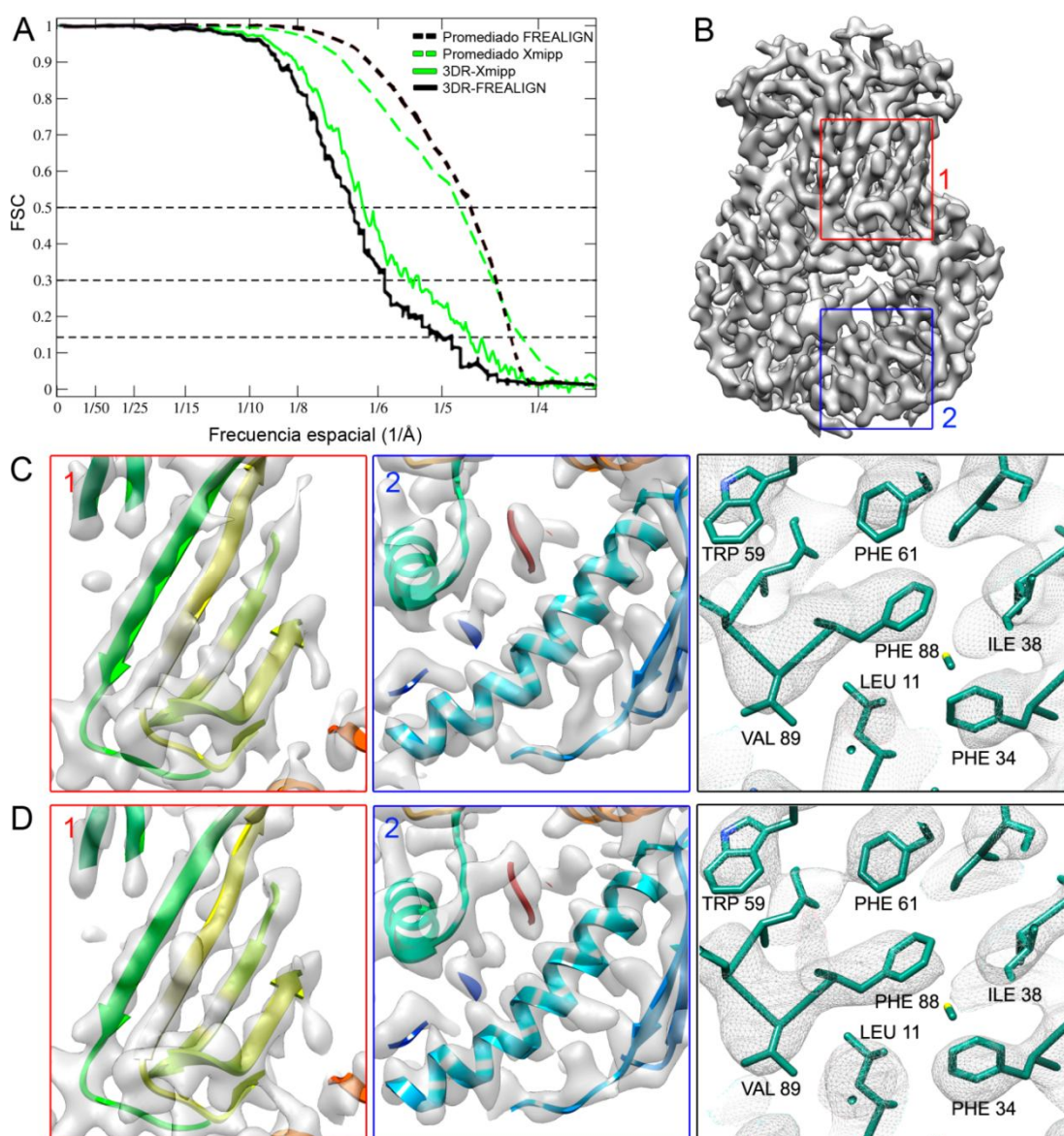
grupo del Dr. Grigorieff consiguiendo incrementar la resolución efectiva del mapa de densidades de 5.1 Å del mapa original a 4.1 Å (FSC 0.143) al aplicar esta simetría no icosaédrica (Fig. 17A, líneas negras continua y discontinua, respectivamente).



**Figura 16. Criome de DLP de rotavirus del microscopio Tecnai F30 FEG 300 kV.** (A) Determinación de la resolución de la 3DR mediante FSC. Las líneas discontinuas negras representan umbrales de FSC iguales a 0.5, 0.3 y 0.143 para los cuales se obtienen resoluciones mostradas en la Tabla 4 para las 3DR calculadas con Frealign (curva negra) y Xmipp (curva verde). (B) Sección central del mapa de densidades de la DLP de rotavirus, vista desde el eje de simetría de orden 2. Las líneas negras indican los ejes de simetría del orden indicado (2, 3 ó 5). (C) Estructura tridimensional de la cápsida de DLP de rotavirus vista desde un eje de simetría de orden dos. La superficie se muestra coloreada radialmente de verde a naranja, de radio interno a externo, y umbralizada a  $2\sigma$  sobre la densidad media. La barra de escala corresponde a 100 Å. Las letras indican los 5 tipos de trímeros. (D) Trímeros segmentados a partir mapa de la cápsida. Las letras indican los 5 tipos de trímeros. (E) Trímero promedio calculado a partir de los 5 tipos de trímeros mostrados en (D).

Siguiendo una aproximación equivalente, los trímeros del mapa de densidades calculado con Xmipp fueron segmentados (Fig. 16D), las relaciones de simetría no cristalográfica entre los monómeros fueron determinadas con el programa super (Estrozi & Navaza, 2010) y se calculó un trímero promedio a partir de las mismas (Fig. 16E). Con el fin de estimar la resolución del trímero promediado, este proceso fue repetido a partir de dos mapas independientes que contienen cada uno la mitad de las partículas empleadas en la reconstrucción final. En base a los criterios de FSC 0.5, 0.3 y 0.143 la resolución calculada para el trímero promediado, fue de

4.5 Å, 4.3 Å y 4.1 Å, respectivamente, (Tabla 4; Fig. 17A, línea verde discontinua). Esta curva de FSC y la publicada previamente (Fig. 17A, línea negra discontinua) muestran un comportamiento similar. La comparación mediante visualización directa de los trímeros promediados a partir de los mapas calculados con FREALIGN (Fig. 17C) y Xmipp (Fig. 17D), confirma que ambos mapas son equivalentes ya que en ambos casos es posible detectar, con similar calidad, elementos característicos de la resolución calculada como son: la individualización de las cadenas constituyentes de cada lámina  $\beta$  (Fig. 17C y D izquierda), el paso de rosca las hélices  $\alpha$  (Fig. 17C y D centro) y las densidades correspondientes a cadenas laterales de aminoácidos voluminosos (Fig. 17C y D izquierda).



**Figura 17. Promediado de los trímeros cuasi-equivalentes de VP6 de rotavirus.** (A) Determinación de la resolución de la 3DR mediante FSC. Las líneas discontinuas negras representan umbrales de FSC iguales a 0.5, 0.3 y 0.143. Los valores de resolución para cada curva se muestran en la Tabla 4. Se muestran las curvas de las 3DR calculadas con FREALIGN (curva negra) y Xmipp (curva verde), así como para los trímeros promediados a partir de las mismas (curva negra discontinua y curva verde discontinua, respectivamente). (B) Trímero promediado a 4.1 Å de resolución. Los recuadros rojo (1) y

azul (2) indican zonas mostradas en detalle en los siguientes paneles. (C) Regiones seleccionadas del trímero promediado a partir del mapa calculado con Frealign y (D) Xmipp con la estructura de rayos X de la proteína VP6 de rotavirus (PDB 1QHD) ajustada en el mapa de densidades. Izquierda (rojo): separación de las cadenas constituyentes de cada lámina  $\beta$ . Centro (azul): Paso de rosca de una hélice  $\alpha$ . Derecha: densidades seleccionadas con el modelo atómico superpuesto mostrándose la clara identificación de cadenas laterales voluminosas.

Estos resultados indican que la metodología de procesamiento digital de imagen utilizada es capaz de recuperar la información de alta resolución. Por lo tanto, los factores limitantes para la obtención de una 3DR con resolución cuasi-atómica de la partícula de PcV podrían estar relacionados con los instrumentos empleados para la adquisición y digitalización de las imágenes.

**Tabla 4. Resolución de las 3DRs de Rotavirus**

Muestra	Resolución (�)		
	FSC=0.5	FSC=0.3	FSC=0.143
3DR-Xmipp <sup>1</sup>	6.3	5.4	4.7
3DR-Frealign <sup>2</sup>	6.5	6.0	5.1
Promediado Xmipp <sup>3</sup>	4.5	4.3	4.1
Promediado Frealign <sup>4</sup>	4.5	4.3	4.1

<sup>1</sup> 3DR generada con el software Xmipp.

<sup>2</sup> 3DR generada con FREALIGN. (Zhang et al., 2008).

<sup>3</sup> Trímero promediado derivado de la 3DR de Xmipp.

<sup>4</sup> Trímero promediado derivado de la 3DR de FREALIGN (Zhang et al., 2008).

### 4.3 Análisis estructural del virus PcV a resolución cuasi-atómica

#### 4.3.1 Criome del virus PcV obtenida en el microscopio Tecnai F30 FEG 300 kV

Los resultados obtenidos en el apartado anterior indican que la metodología de procesamiento de imagen y 3DR utilizada es capaz de recuperar información de alta resolución a partir de imágenes de DLPs de rotavirus adquiridas en un microscopio Tecnai F30 FEG estabilizado a 300 kV sobre micrografías electrónicas digitalizadas con un escáner Zeiss Photoscan TD. Gracias a la colaboración establecida con el Dr. Grigorieff, se registró un nuevo conjunto de imágenes de partículas de PcV con los mismos equipos y en condiciones equivalentes de adquisición y digitalización a las anteriormente empleadas para las DLPs de rotavirus (Fig 18A). Como principales diferencias respecto al conjunto de datos de PcV previamente empleados (*ver apartado 4.2.1*) cabe destacar: (1) el superior voltaje de aceleración empleado (300 kV en lugar de 200 kV), (2) el alineamiento libre de coma del haz de electrones realizado en el microscopio Tecnai F30 y, (3) la monitorización de la deriva mecánica de la muestra como requisito previo al registro de las micrografías. Además, con el fin de evaluar la bondad del escáner Nikon Coolscan 9000ED, disponible en el laboratorio, frente al Zeiss Photoscan TD para la digitalización de imágenes con información de alta resolución, las micrografías

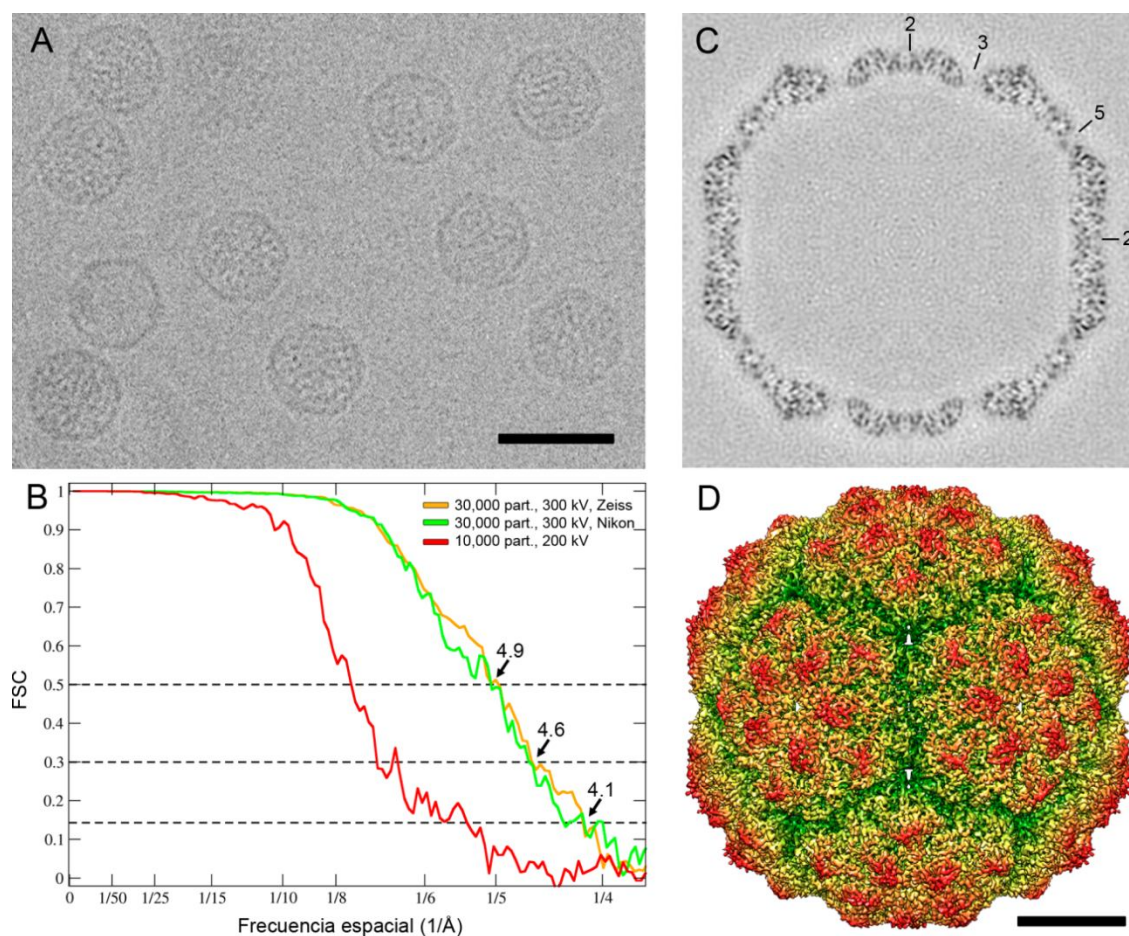
electrónicas fueron digitalizadas con ambos equipos. A partir de las mismas 30,628 imágenes de partículas de PcV extraídas de las micrografías digitalizadas con uno u otro escáner se calcularon mapas de densidades que presentan curvas de FSC esencialmente equivalentes. Ambas 3DRs tienen una resolución de 4.9 Å, 4.6 Å y 4.1 Å, en base a los criterios de FSC 0.5, 0.3 y 0.143, respectivamente (Fig. 18B, Tabla 5). Aunque la inspección visual de ambos mapas no muestra diferencias significativas en el nivel de detalle de sus densidades, la FSC de la 3DR derivada de imágenes digitalizadas en el equipo Nikon es ligeramente inferior a las del Zeiss en algunas frecuencias espaciales (5.7 - 5 Å y 4.4 - 4.1 Å), por lo que las imágenes provenientes de éste último, así como la 3DR calculada a partir de las mismas, fueron utilizadas a partir de este punto (Fig. 18C y D).

La comparación de las curvas de resolución de las 3DR derivadas de imágenes adquiridas a 300 kV (PcV-300, Fig. 18B curvas naranja y verde) y a 200 kV (PcV-200, Fig. 18B curva roja) muestra un incremento de los valores de FSC a todas las frecuencias espaciales, indicando una clara mejora en la resolución de las nuevas 3DR. Este incremento contrasta con el obtenido previamente al aumentar el número de imágenes constituyentes del conjunto de datos del microscopio Tecnai FEG G<sup>2</sup> 200 kV (Apartado 4.2.1, Fig. 15), donde sólo se observaba un incremento en las altas frecuencias. El análisis de la CTF determinada para imágenes tomadas en los dos microscopios (Fig. 19) muestra que en ambos casos es posible detectar la presencia de ceros en la función hasta al menos 4.7 Å de resolución. Sin embargo, este análisis queda limitado a las intensidades de la CTF, pero no evalúa las fases de la misma a alta resolución. La cantidad de factores que pueden influir en la recuperación de las fases de alta resolución son variados (alineamiento del haz de electrones, condiciones de la toma de imágenes, voltaje de aceleración de los electrones, etc.), y es objeto de estudios profundos en el campo dada su importancia clave para la obtención de 3DRs con resolución atómica y cuasi-atómica (Grigorieff & Harrison, 2011; Zhang & Zhou, 2011). Estos factores podrían dar cuenta de los resultados obtenidos a partir de las imágenes adquiridas en ambos microscopios.

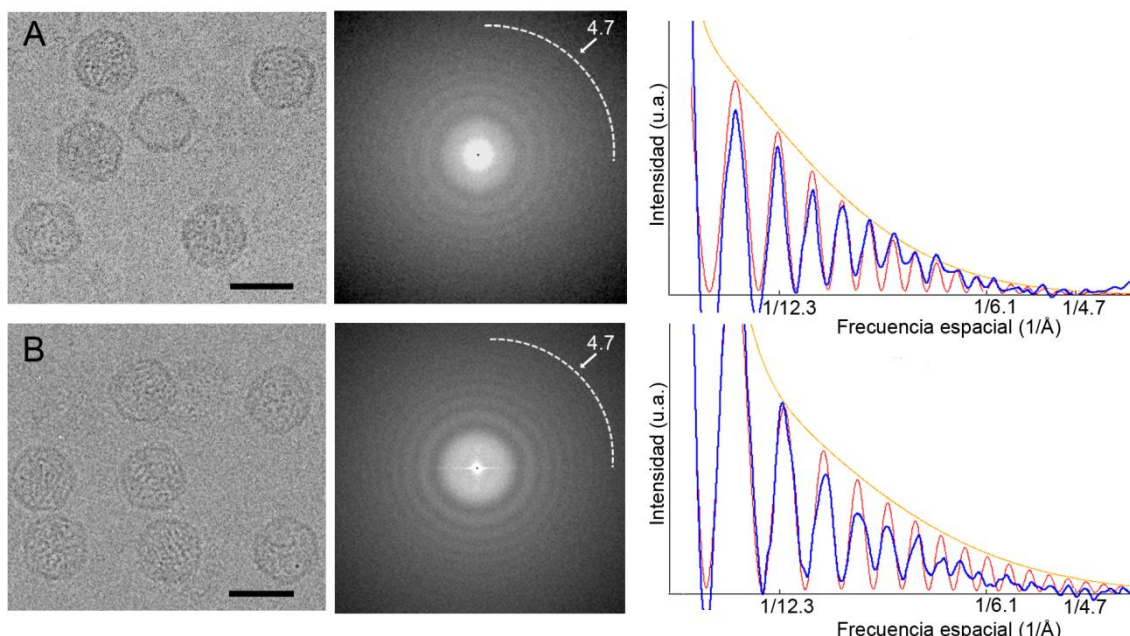
La visualización directa de las imágenes de criome de viriones de PcV muestra la presencia de partículas que contienen material genético en su interior (llenas) y de partículas vacías (Fig. 15A y Fig. 18A). Siguiendo la misma aproximación empleada previamente para la determinación de la estructura de la cápsida de PcV a nivel subnanométrico (Luque et al., 2010), ambos tipos de partículas fueron procesadas conjuntamente. Para comprobar la bondad de esta aproximación, cada uno de estos grupos (cápsidas llenas y vacías) fue procesado independientemente y sus respectivas 3DR calculadas. Las resoluciones obtenidas en base a los criterios de FSC 0.5, 0.3 y 0.143 fue de 5.3, 4.7 y 4.3 Å para cápsidas llenas y de 6.9, 6.7 y 6.2 Å para cápsidas vacías (Fig. 20A, Tabla 5). Estos resultados sugieren una relación directa



entre el número de partículas utilizadas en las reconstrucciones (20,552 para llenas, 7,014 para vacías y 27,565 para su mezcla) y la resolución obtenida. La visualización directa de las densidades correspondientes a cada 3DR correlaciona con las resoluciones determinadas por FSC. Además, la mejor resolución del mapa obtenido procesando conjuntamente ambos tipos de partículas indica que sus cápsidas son globalmente equivalentes a la resolución obtenida. Para evaluar esta identidad, fue calculado un mapa diferencia entre las 3DRs de cápsidas llenas y vacías que indica que las cápsidas son esencialmente iguales, excepto en dos zonas puntuales correspondientes a la interacción del material genómico con la cápsida (véase apartado 4.3.2).

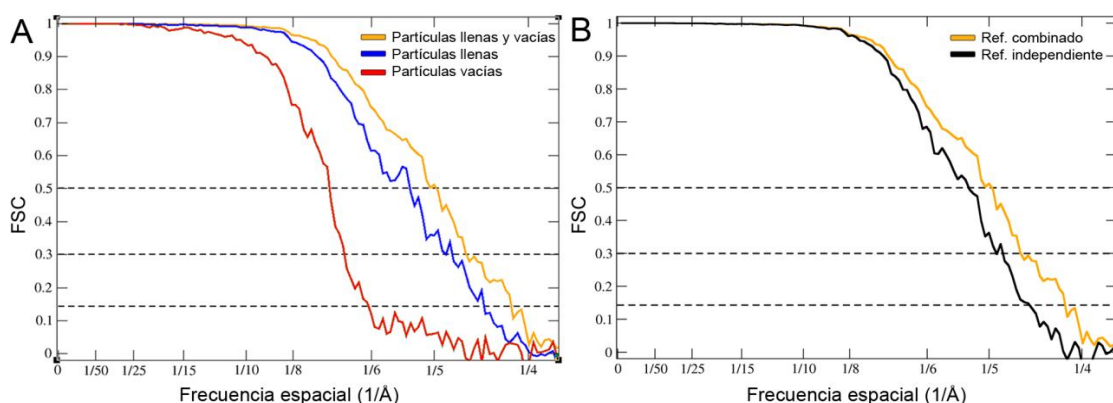


**Figura 18. CrioME de PcV del microscopio Tecnai F30 FEG 300 kV.** (A) Criomicrografía electrónica de cápsidas virales de PcV adquirida en el microscopio Tecnai F30 operado a 300 kV. La barra de escala corresponde a 500 Å. (B) Determinación de la resolución de la 3DR mediante FSC. La curva roja corresponde a la 3DR calculada con 9,848 partículas adquiridas en el microscopio Tecnai G<sup>2</sup> FEG 200 kV (PcV-200). Las curvas verde y naranja corresponden a las 3DRs calculadas con 27,565 partículas adquiridas en el microscopio Tecnai F30 300 kV (PcV-300) y escaneadas en el escáner Nikon o Zeiss, respectivamente. Las líneas discontinuas negras representan umbrales de FSC iguales a 0.5, 0.3 y 0.143. Las resoluciones se indican en la tabla 5. (C) Sección central del mapa de densidades de la partícula de PcV-300, vista desde el eje de simetría de orden 2. (D) Estructura tridimensional de la cápsida de PcV-300 vista desde un eje de simetría de orden dos. La superficie se muestra coloreada radialmente de verde a rojo, de radio interno a externo, respectivamente, y umbralizada a  $2\sigma$  sobre la densidad media. La barra de escala corresponde a 100 Å



**Figura 19. Comparación de las CTFs de imágenes adquiridas en los microscopios Tecnai G<sup>2</sup> 200kV y Tecnai F30 300kV.** (A) Determinación de la CTF del microscopio Tecnai G<sup>2</sup> 200 kV. Izquierda: Criomicrografía electrónica. Centro: espectro de potencia promediado radialmente. En líneas discontinuas blancas se muestra la posición de la frecuencia espacial equivalente a 4.7 Å. Derecha: CTF experimental (curva azul) y teórica (roja) determinadas con el programa bshow. Las intensidades se indican en unidades arbitrarias (u.a.). (B) Determinación de la CTF del microscopio Tecnai F30 300 kV: se muestran paneles equivalentes a los de (A)

Con el objetivo de realizar una estimación independiente de la resolución del mapa de densidades, se dividió aleatoriamente el conjunto de 30,628 imágenes en dos grupos equivalentes que fueron procesados de forma independiente. Se determinó la FSC entre las 3DRs independientes calculadas a partir de estos grupos (Fig. 20B curva negra), obteniéndose unos valores de FSC de 5.2 Å, 4.8 Å y 4.5 Å en base a los criterios de 0.5, 0.3 y 0.143, respectivamente (Tabla 5). Estos valores de FSC son compatibles con los obtenidos previamente. Los valores ligeramente menores observados podrían ser atribuidos a que, mientras en el refinamiento combinado las orientaciones de las partículas son determinadas usando como referencia un mapa calculado a partir de todas las partículas, en el refinamiento de grupos independientes las referencias son calculadas a partir de la mitad de las partículas. La comparación directa de las densidades de ambos mapas permite la visualización de características estructurales equivalentes en ambos casos en consonancia con los valores de resolución calculados.



**Figura 20. Resolución de las 3DRs de PcV-300.** (A) Determinación de la resolución mediante FSC de las 3DRs de partículas vacías (rojo), llenas (azul) y mezcladas (llenas y vacías, naranja) de PcV. (B) Determinación de la resolución mediante FSC a partir de dos 3DRs calculadas en refinamientos independientes (negro) o de dos 3DRs calculadas dividiendo en dos grupos las partículas previamente orientadas en un refinamiento conjunto con todas las partículas (naranja). Las líneas discontinuas negras representan umbrales de FSC iguales a 0.5, 0.3 y 0.143. Las resoluciones se indican en la tabla 5.

**Tabla 5. Resolución de las 3DRs de PcV-300**

Muestra	Resolución (Å)		
	FSC=0.5	FSC=0.3	FSC=0.143
<i>PcV-200</i>	7.6	6.9	5.5
<i>PcV-300 zeiss</i> <sup>1</sup>	4.9	4.6	4.1
<i>PcV-300 nikon</i> <sup>2</sup>	4.9	4.6	4.1
<i>PcV-300 ref. independiente</i> <sup>3</sup>	5.2	4.8	4.5
<i>PcV-300 cápsidas llenas</i>	5.3	4.7	4.3
<i>PcV-300 cápsidas vacías</i>	6.9	6.7	6.2

<sup>1</sup> 3DR generada con imágenes provenientes del scanner Zeiss.

<sup>2</sup> 3DR generada con imágenes provenientes del scanner Nikon.

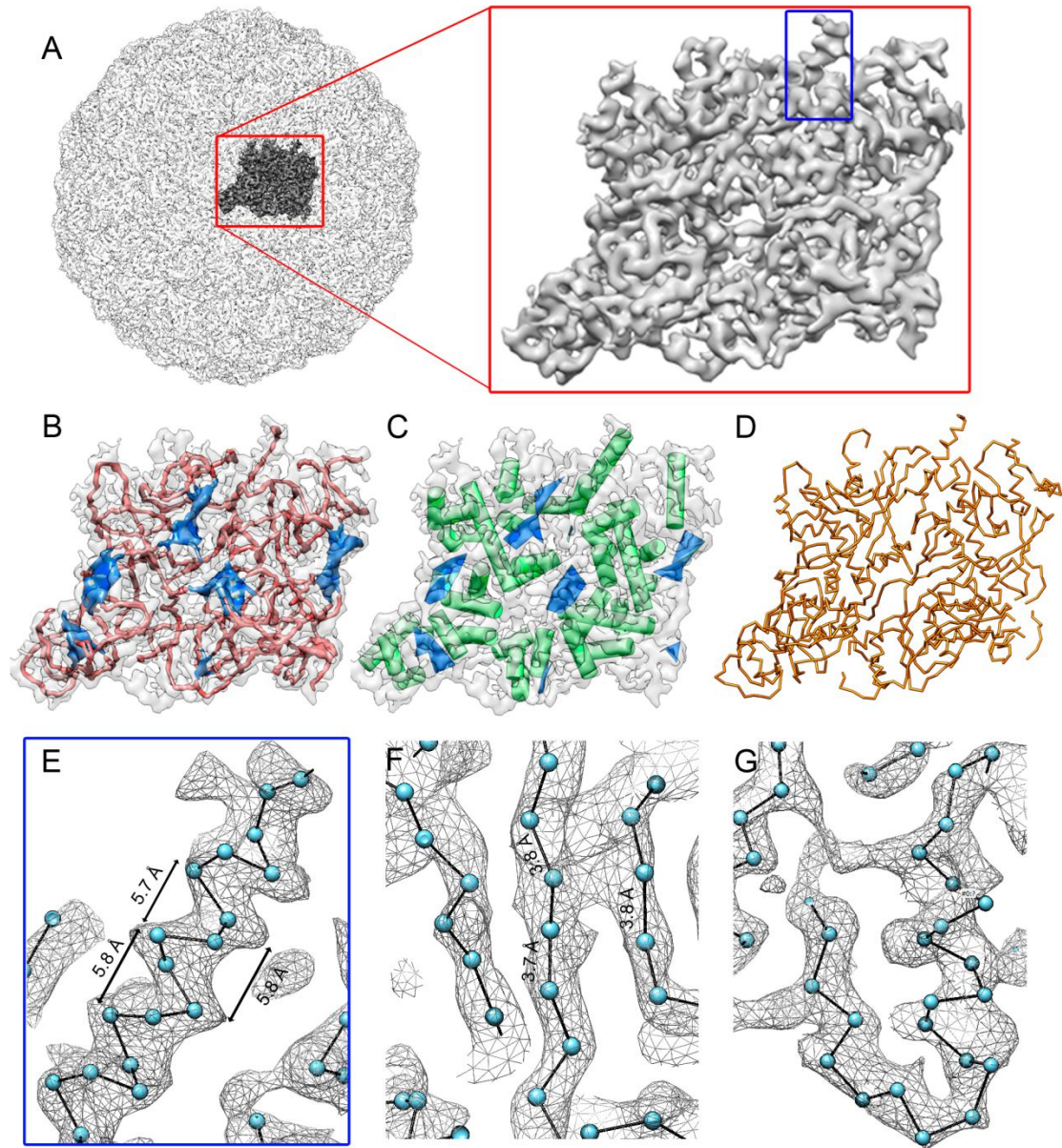
<sup>3</sup> Cálculo de resolución mediante la generación de dos reconstrucciones totalmente independientes.

#### 4.3.2 Construcción de la cadena peptídica de la CP de PcV

Mediante la evaluación de las conectividades del mapa se delimitó la densidad correspondiente a una subunidad asimétrica de la cápsida (Fig. 21A) y se estimó la presencia y localización de SSE en la misma con programa SSEHunter (Baker et al., 2007). Este proceso permite tanto la generación de un modelo de SSE de la subunidad asimétrica como la creación de un esqueleto del mapa de densidades para evaluar la conectividad entre dichos SSE (Fig. 21B y C). Una vez obtenida esta información se emplearon de forma conjunta y complementaria los programas Coot (Emsley et al., 2010) y Gorgon (Baker et al., 2011) para sustituir los SSE por C $\alpha$  y determinar y trazar la conectividad entre los mismos mediante: (1) la evaluación de la continuidad del mapa de densidades a diferentes niveles de umbralización, (2) el esqueleto del mapa de densidades y (3) las posibles correspondencias entre los SSE previamente predichos a partir de la secuencia de la CP y los determinados



experimentalmente sobre el mapa de densidad (Fig. 21D-G). Mediante esta aproximación fue posible la generación de un modelo de C $\alpha$  de la cadena peptídica de la CP de PcV.



**Figura 21. Construcción del modelo de C $\alpha$  de la CP de PcV.** (A) 3DR de la cápsida de PcV donde se muestra una subunidad asimétrica en gris. Recuadro rojo: subunidad asimétrica segmentada de PcV. (B) Esqueleto de la subunidad asimétrica, que representa la forma, topología y densidad de la misma de la densidad de la misma. En rojo se representan densidades correspondientes a hélices  $\alpha$  o lazos y, en azul densidades correspondientes a láminas  $\beta$ . (C) Representación de la anotación de SSE determinados a partir del mapa de densidades, en el que las láminas  $\beta$  son mostradas como planos azules y las hélices  $\alpha$  como cilindros verdes. (D) Modelo de C $\alpha$  de la subunidad asimétrica de PcV. (E) Detalle de una hélice  $\alpha$  en el mapa de densidad. La hélice se localiza en la zona indicada por el recuadro azul del panel (A) y se corresponde con la mostrada la Fig. 15C y D. Las flechas y números indican el paso de rosca de la hélice. (F) Detalle de la separación de tres cadenas formando una lámina  $\beta$ . Se indica la distancia medida entre los C $\alpha$ . (G) Vista de la definición y continuidad de un lazo entre SSE. Todas las densidades están representadas a un nivel de umbralización de  $2.7\sigma$ .

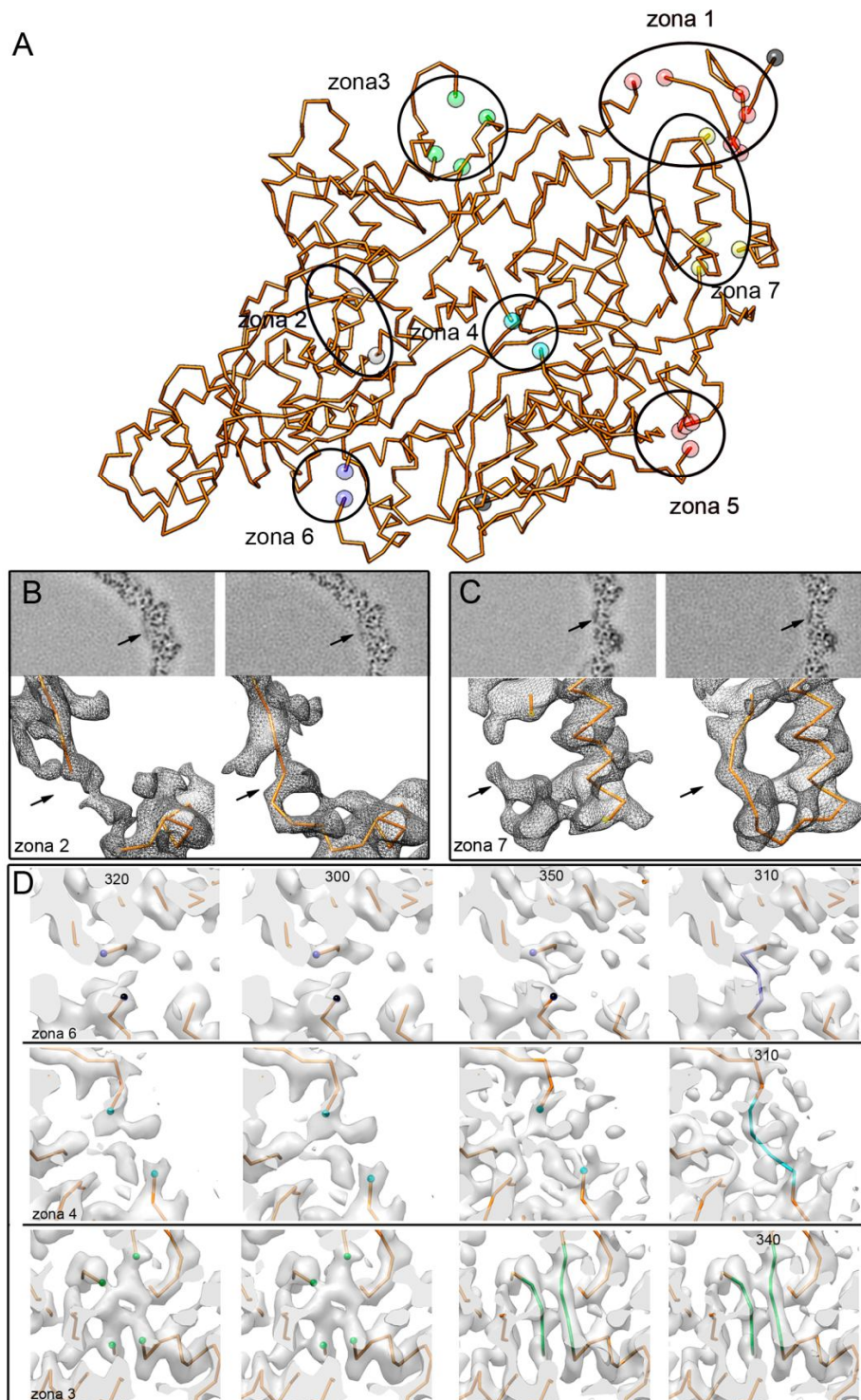
La visualización directa de este modelo junto con el mapa de densidades permite evaluar características estructurales propias de alta resolución como son: el paso de rosca de las hélices  $\alpha$  (cuyas distancias características son entre 5.7 - 5.8 Å), la separación entre hojas constituyentes de las láminas  $\beta$  y el patrón en zigzag de los  $C\alpha$  que las forman (separados por ~3.8 Å); y la definición de los lazos que conectan los SSE de la proteína (Fig. 21E-G). La visualización directa de estas características estructurales valida la resolución de ~4 Å previamente determinada a partir de las curvas de FSC.

Durante la generación del modelo de  $C\alpha$  de la CP de PcV se localizaron siete zonas del mapa donde la densidad no presentaba continuidad o era ésta era ambigua (Fig. 22A). El trazado de la cadena en estos puntos se realizó mediante 3 aproximaciones:

- Aunque de forma global el mapa de densidades calculado a partir de la mezcla de imágenes de partículas llenas y vacías presenta una mayor resolución que el calculado únicamente a partir de imágenes de partículas llenas (Fig. 20B), éste último presenta de forma local una mejor definición en las zonas de contacto entre la cápsida y el genoma del virión. Este hecho podría indicar un papel estabilizador del dsRNA. Las zonas discontinuas 2 y 7 se localizan en estos puntos de contacto. La evaluación de la continuidad de la densidad en mapa calculado con partículas llenas para estos puntos permite el trazado inequívoco de la cadena (Fig. 22B y C).

- La compensación de la atenuación de las amplitudes en las altas frecuencias es un paso crítico para la interpretación de un mapa de criome a media y alta resolución. En el caso de la cápsida de PcV la aplicación de un factor de temperatura negativo (factor B) de 320 Å<sup>2</sup> fue determinada como óptima para la 3DR de forma global. Sin embargo, la resolución del mapa de densidades es intrínsecamente anisotrópica por lo que puede ser necesaria la aplicación de diferentes factores B para interpretar diferentes zonas de la 3DR (Zhou, 2008). En este contexto, se calcularon mapas corregidos con diferentes factores B y se evaluó la densidad electrónica de las zonas inconexas. Se determinaron factores B óptimos de -340 Å<sup>2</sup> para la zona 2 y de -310 Å<sup>2</sup> para las zonas 4 y 6 con los que es posible definir inequívocamente la continuidad de la densidad (Fig. 22D).

- Las zonas 1 y 5, aunque localizadas en dos regiones de la subunidad asimétrica, se corresponden a una única área en el contexto tridimensional de la cápsida. El modelo de  $C\alpha$  generado presenta varias discontinuidades en estas zonas compatibles con la presencia 1 o 2 residuos. Aunque la densidad electrónica no permite asignar sin ambigüedad la continuidad entre estos extremos en esta etapa de la construcción del modelo, la posterior asignación de secuencia permite definirlos inequívocamente (apartado 4.3.3).



**Figura 22. Solución de discontinuidades en el modelo de Ca de la CP de PcV.** (A) Modelo de Ca cadena polipeptídica de la CP de PcV. Las zonas de discontinuidad están señaladas con círculos negros y numeras de 1 a 7 de N-terminal a C-terminal de la proteína. Las esferas de colores indican los extremos desconectados de las siete zonas. (B) Comparación de la 3DR de cápsidas llenas + vacías (izquierda) y la llenas (derecha) para la zona 2. Los paneles superiores muestran secciones de 6 Å, desplazadas 33 Å de la sección central, donde se indican con flechas la densidad bajo análisis. Los paneles inferiores muestran la densidad bajo estudio junto con el modelo de Ca inconexo (izquierda) o una vez determinada su conectividad. (C) Comparación de la 3DR de cápsidas llenas + vacías (izquierda) y la llenas (derecha) para la zona 7. Se muestran secciones, mapas y modelos equivalentes a

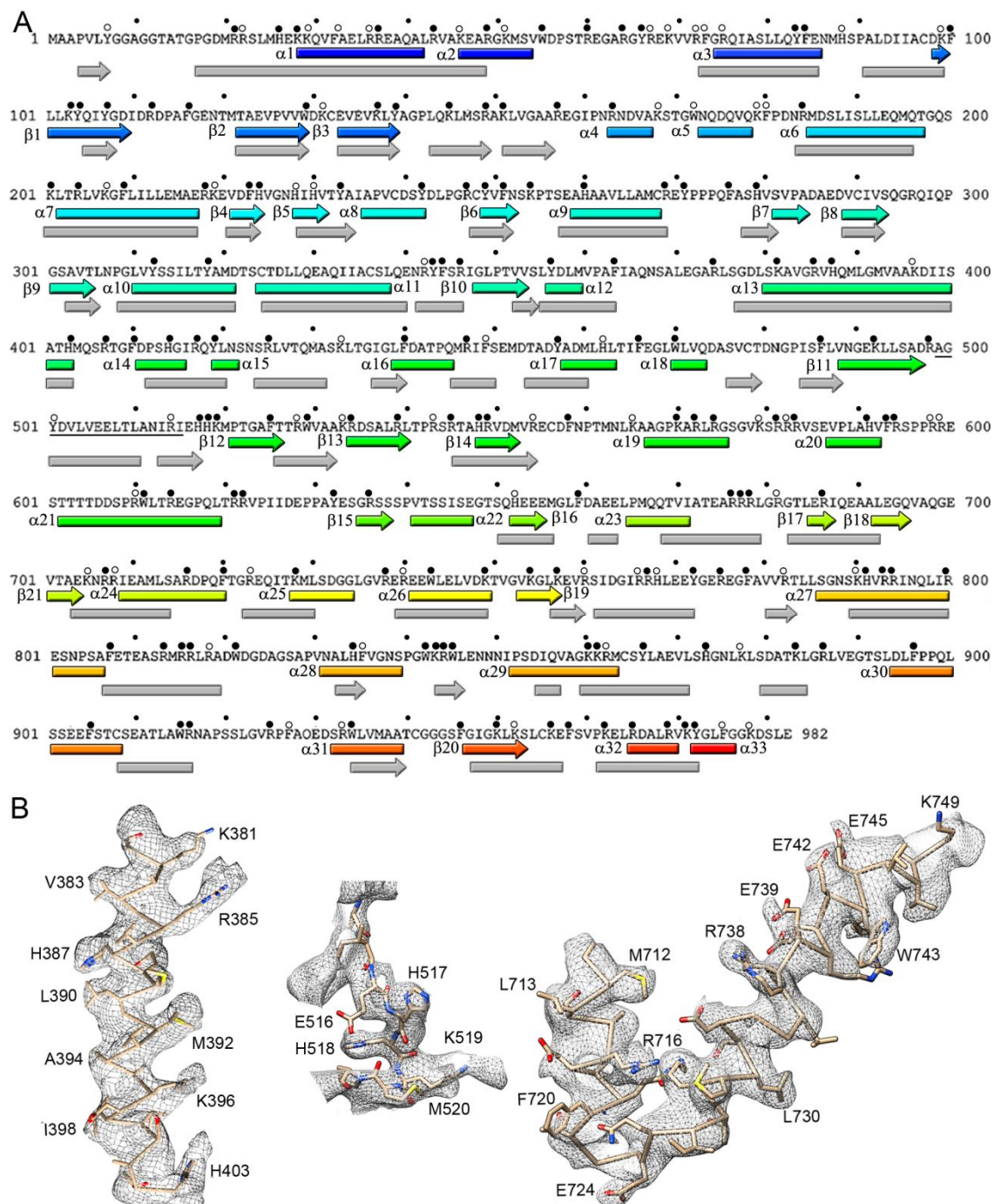
los del panel (B). (D) Análisis y determinación de la continuidad para las zonas 6 (arriba), 4 (centro) y 3 (abajo). Se muestra la densidad de la zona bajo estudio correspondiente a mapas cuya atenuación de amplitudes ha sido corregida con un factor B de  $-320 \text{ \AA}^2$  (izquierda),  $-300 \text{ \AA}^2$  (centro-izquierda),  $-350 \text{ \AA}^2$  (centro-derecha) o el factor B determinado como óptimo ( $-310$  ó  $-340 \text{ \AA}^2$ ) para la zona. Superpuesto a la densidad se muestra modelo de C $\alpha$  inconexo o una vez determinada su conectividad según la continuidad del mapa densidades.

#### 4.3.3 Construcción y validación del modelo atómico de PcV

A partir del modelo de C $\alpha$  obtenido se generó un modelo de polialaninas como base para la determinación del registro de la secuencia de aminoácidos sobre el modelo. Como punto de partida se empleó la comparación directa de las hélices  $\alpha$  predichas a partir de la secuencia de la CP (Fig. 23A, SSE en gris) con las densidades identificadas como hélices  $\alpha$  en el modelo de C $\alpha$ . Mediante la coincidencia de cadenas laterales voluminosas y densidades electrónicas compatibles con las mismas fue posible identificar inequívocamente dos motivos en el mapa: (1) la larga hélice  $\alpha 13$  (Fig. 23B, izquierda) y (2) la región formada por las tres hélices consecutivas  $\alpha 24$ ,  $25$  y  $26$ , separadas por muy pocos residuos (Fig. 23B, derecha) y precedidas por un motivo de dos histidinas y una lisina, muy bien localizado en el mapa de densidad (Fig. 23B, centro). Una vez identificados estos motivos, el registro de la secuencia aminoacídica fue extendido empleando la presencia de densidades compatibles con cadenas laterales de aminoácidos voluminosos (H, K, R, F, Y y W) como puntos de anclaje para validar dicho registro (Fig. 23A, residuos indicados con puntos negros). Mediante esta aproximación es posible determinar la localización densidades compatibles con el  $\sim 70\%$  de los residuos voluminosos (Fig. 23A, residuos indicados con puntos negros). El  $\sim 30\%$  restante podrían corresponderse con cadenas laterales de mayor movilidad o zonas de peor resolución (Fig. 23A, residuos indicados con puntos blanco). La comparación de la predicción de SSE a partir de la secuencia con los determinados experimentalmente muestra una clara coincidencia entre ambos en la mitad N-terminal de la proteína, mientras que es mucho menor en la región C-terminal.

Una vez determinado el registro de la secuencia de aminoácidos, se optimizó el ajuste del modelo atómico al mapa de densidades mediante ciclos iterativos de refinamiento de la posición de sus coordenadas y de optimización de la geometría de las mismas hasta que no se observó una mejora significativa en las mismas. El análisis del mapa de Ramachandran (Fig. 24A izquierda) muestra que 789 residuos (82 %) se encuentran en regiones preferentes del mismo, mientras que 114 (12%) residuos están en zonas permitidas y sólo 58 residuos (6%) se





**Figura 23. Registro de la secuencia de aminoácidos de la CP de PcV en el mapa de densidad.** (A) Secuencia de la CP de PcV sobre la que se indican: (1) Los SSE determinados experimentalmente mediante barras (hélices  $\alpha$ ) y flechas (cadenas  $\beta$ ) coloreadas de N-terminal (azul) a C-terminal (rojo). (2) Los SSE predichos a partir de la secuencia (Luque et al., 2010) coloreados en gris. (3) Las densidades coincidentes con cadenas laterales voluminosas mediante puntos negros grandes. (4) Los residuos con cadenas laterales voluminosas para los que no se identifica densidad electrónica mediante círculos blancos. Las bolas negras pequeñas indican pasos de 10 residuos. (B) Ajuste de las coordenadas atómicas del registro determinado sobre el mapa de densidad, representado en mallas. Izquierda: hélice  $\alpha_{13}$ . Centro: motivo H517-K519. Derecha: hélices  $\alpha_{24}$ ,  $\alpha_{25}$  y  $\alpha_{26}$  ajustado al mapa de densidad.



encuentran en regiones prohibidas. El mapa de densidades criome permitió el registro y localización de todos los residuos de las regiones 1-498 y 516-982, así como definir la conectividad mediante  $C\alpha$  del lazo que une ambas regiones (Fig. 23A, subrayado. Fig. 25). El modelo atómico final da cuenta de los 982 residuos de la CP de PcV, presenta una coincidencia óptima con el mapa de criome y posee una geometría correcta (Fig. 4.24).

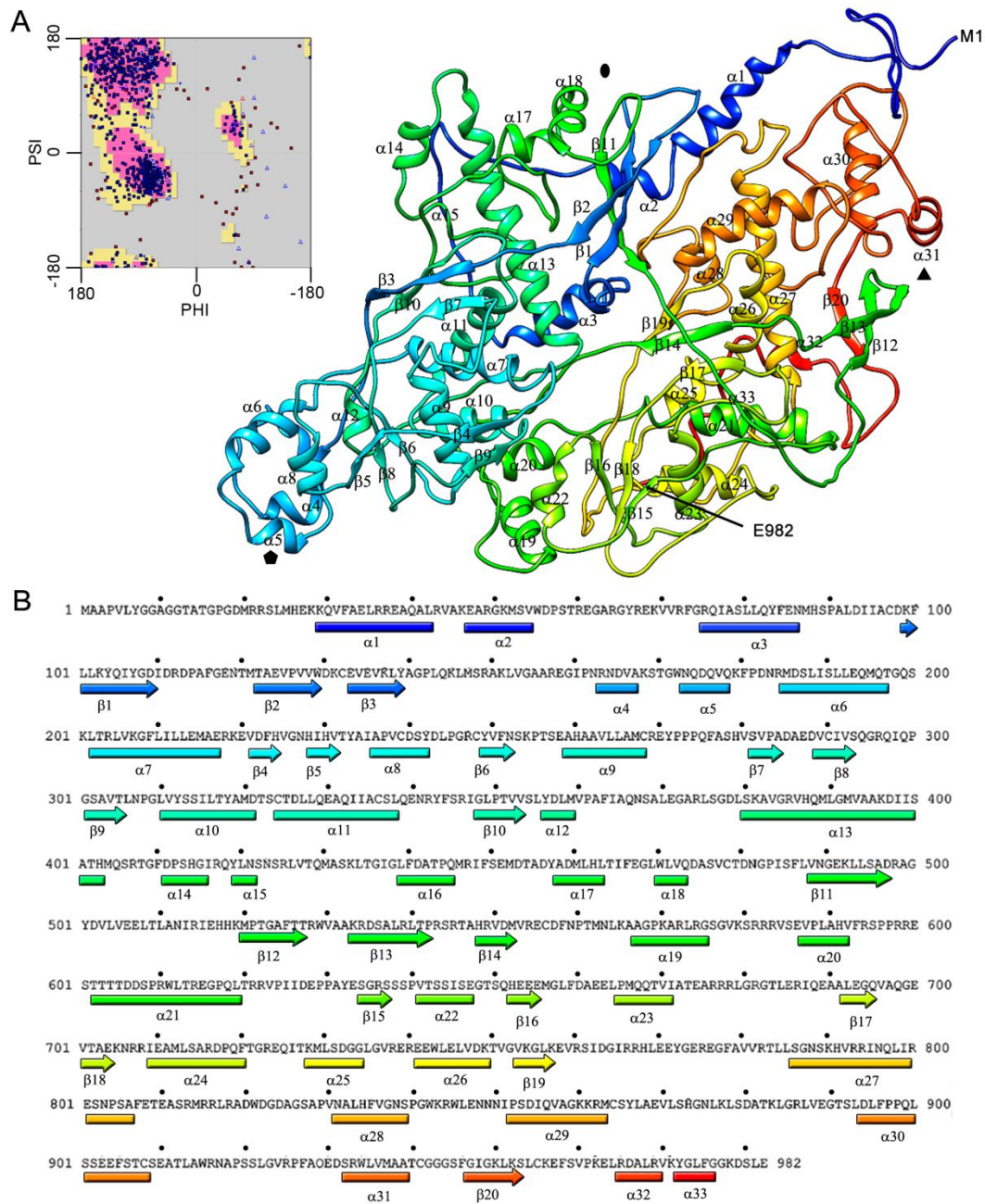
#### **4.4 Análisis del modelo atómico de la CP de PcV**

##### **4.4.1 Modelo atómico de la CP de PcV**

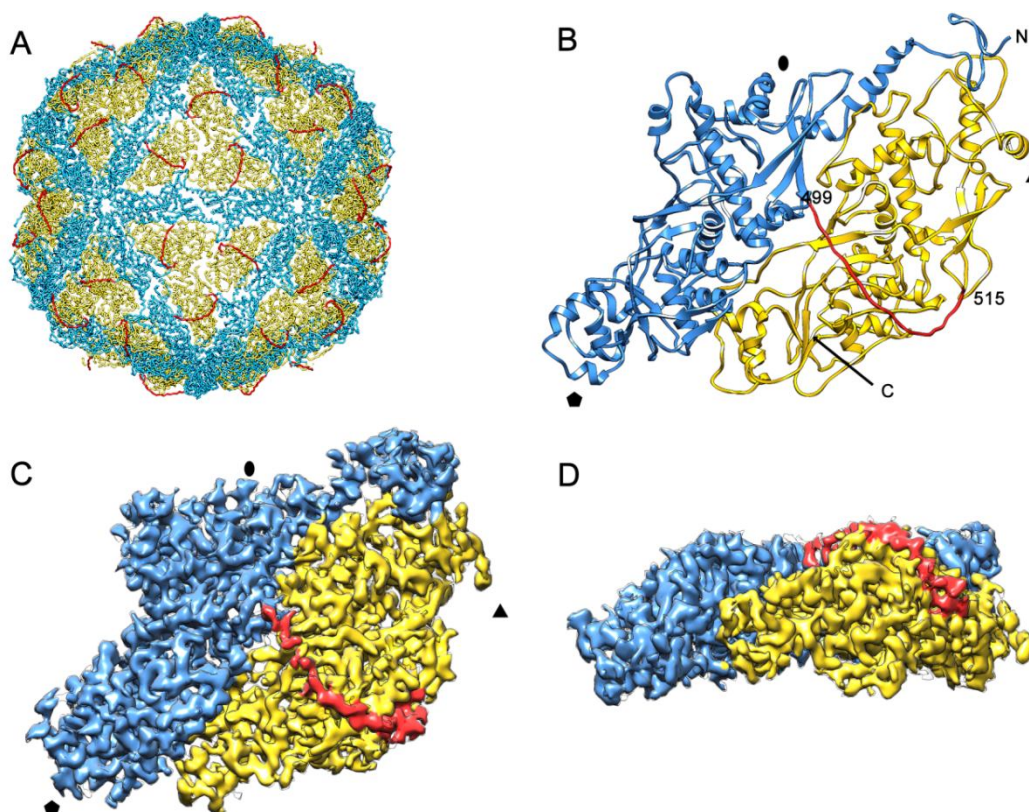
La topología general del modelo atómico de la CP de PcV es coincidente con la descrita previamente a resolución subnanométrica y consiste en una estructura romboide de 135 Å de largo, 90 Å de ancho y 55 Å de altura (Fig. 24). La estructura está formada por 33 hélices  $\alpha$  y 20 cadenas  $\beta$  organizadas en dos dominios (A y B) de morfología similar. El dominio A corresponde a la mitad amino de la proteína (definido desde el residuo 1 hasta el 498) y está formado por 18 hélices  $\alpha$  y 11 cadenas  $\beta$  organizadas en 4 láminas  $\beta$ . El dominio B corresponde a la mitad carboxilo (definido desde el residuo 516 hasta el 982) y contiene 17 hélices  $\alpha$  y 9 cadenas  $\beta$  que forman 3 láminas  $\beta$ . Cada dominio contiene la característica larga hélice  $\alpha$  tangencial a la superficie de la cápsida (dominio A:  $\alpha 13$ , 24 residuos, 36 Å; dominio B:  $\alpha 27$ , 21 residuos, 31.5 Å).

De forma general, ambos dominios presentan un plegamiento compacto que tiene como punto inicial y final una lámina  $\beta$  compuesta por dos cadenas amino terminal (dominio A:  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ; dominio B:  $\beta 12$  y  $\beta 13$ ) y una carboxilo terminal (dominio A:  $\beta 11$ ; dominio B:  $\beta 20$ ). Ambas mitades se encuentran conectadas por un lazo de 16 aminoácidos (residuos 499-515) que conecta la cadena  $\beta 11$  del dominio A y cadena  $\beta 12$  del dominio B quedando expuesto en el exterior de la cápsida (Fig. 25A). Aunque la densidad de criome no permite la determinación del registro y coordenadas exactas de los residuos de este lazo, es posible determinar inequívocamente la continuidad de su densidad y trazar la cadena peptídica mediante  $C\alpha$  (Fig. 25B-D).

Al igual que ocurre en la arquitectura de las cápsidas T=1 formadas por 120 subunidades de totivirus y reovirus, las dos mitades de la CP de PcV se organizan formando un dodecámero donde cinco dominios A están en contacto directo con los ejes de simetría quinario y cinco dominios B se intercalan entre los anteriores (Fig. 25).



**Figura 24. Modelo atómico de la CP de PcV.** (A) Representación del modelo atómico de la CP de PcV coloreado de N-terminal (azul) a C-terminal (rojo). Se indican el primer (M1) y el último residuo (E982) de la CP y cada SSE. El recuadro muestra el mapa de Ramachandran del modelo atómico. Las zonas rosas y amarillas representan regiones preferentes y permitidas del mapa, respectivamente. Todos los residuos son representados mediante cuadrados a excepción de las glicinas que son representadas mediante triángulos. Los residuos en azul se encuentran en zonas preferidas o permitidas del mapa, mientras los rojos se encuentran fuera de las mismas. (B) Secuencia de la CP de PcV sobre la que se indican: los SSE determinados experimentalmente mediante rectángulos (hélices  $\alpha$ ) y flechas (cadenas  $\beta$ ) coloreados de N-terminal (azul) a C-terminal (rojo).



**Figura 25. Organización y conectividad de los dominios A y B de la CP de PcV.** (A) Modelo atómico de la cápsida de PcV vista desde el eje de simetría de orden 2. Se representa en azul el dominio A (1-498), en amarillo el dominio B (516-982) y en rojo el lazo de unión entre ambos dominios (499-515). (B) Representación de cintras del modelo atómico de la CP de PcV. Se indican los extremos N-terminal (N), el C-terminal (C) de la proteína así como el primer (499) y último (515) residuo del lazo de unión. (C) Vista superior y (D) lateral del mapa de densidad de criome de la subunidad asimétrica de PcV umbralizado a  $2\sigma$  y con las densidades coloreadas según el esquema de los paneles (A) y (B).

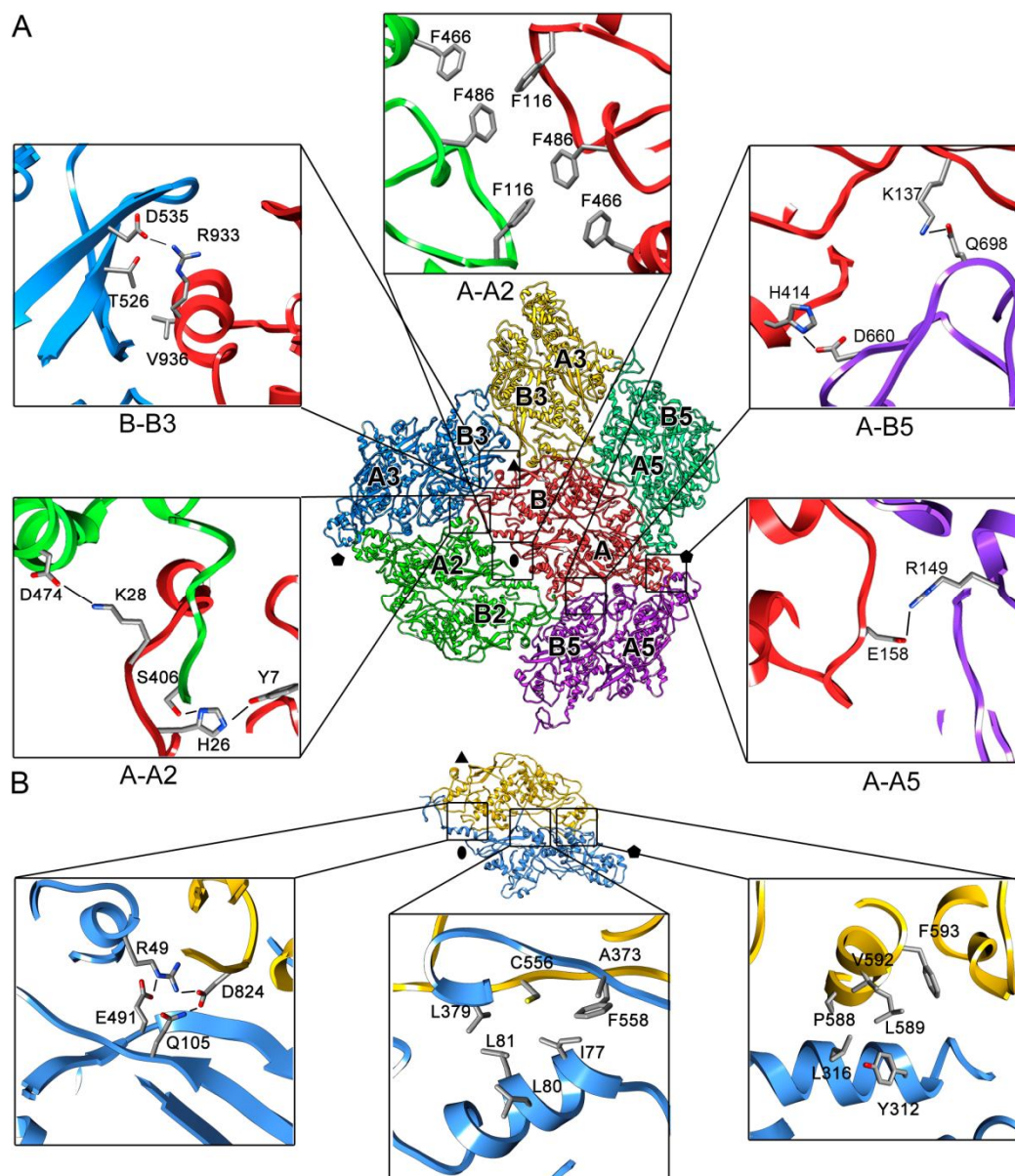
#### 4.4.2 Interacciones proteína-proteína que estabilizan la cápsida de PcV

La estructura de la cápsida de PcV está estabilizada por la interacción de la CP con 5 subunidades vecinas (Fig. 26A). A su vez, cada una de estas subunidades está formada por dos dominios con una gran superficie de interacción entre sí (Fig. 26B). Esta superficie presenta dos regiones diferenciadas: la más cercana al eje de simetría de orden 5, mediada por interacciones de carácter hidrofóbico (Fig. 26B, recuadros centro y derecha) y la más próxima al eje de simetría de orden 2, que contiene fundamentalmente interacciones de naturaleza polar (Fig. 26B, izquierda; Tablas 6 y 8).

El análisis de las interacciones de la CP con las cinco subunidades adyacentes muestra que está en contacto con 10 dominios de moléculas vecinas a través de 110 residuos. Teniendo en cuenta las relaciones de simetría, estas interacciones son equivalentes dos a dos, por lo que es



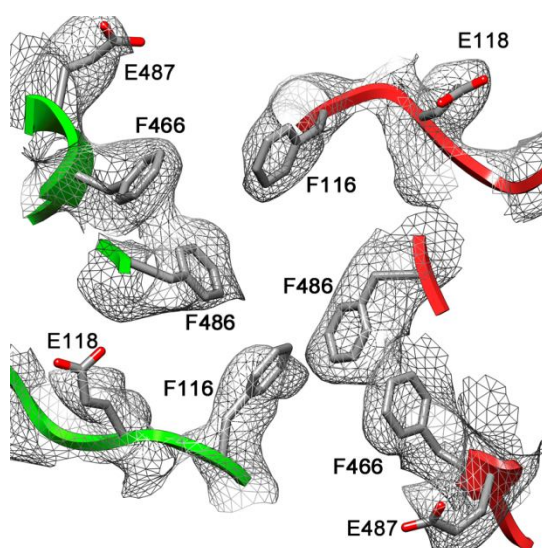
posible definir 55 interacciones únicas de la CP que implican a 5 tipos dominios adyacentes (Fig 26A y Tablas 7 y 8).



**Figura 26. Interacciones intramoleculares e intermoleculares de la CP de PcV.** (A) Interacciones intermoleculares. Se muestra la estructura atómica de la CP de PcV (rojo) rodeada de las CP vecinas (violeta, verde claro, azul, amarillo, verde). La nomenclatura (2, 3 y 5) indica la relación de simetría (orden del eje) de los dominios de cada subunidad respecto a la representada en rojo. Los paneles muestran interacciones representativas de las superficies de interacción entre los dominios indicados. (B) Interacciones intramoleculares. Se muestra la estructura de la CP con los dominios A y B representados en azul y amarillo, respectivamente. Los paneles muestran interacciones representativas de la superficie de interacción entre ambos dominios. Los ejes de simetría se indican mediante figuras geométricas.

Un gran parte de estas interacciones (32 de 55 definidas) corresponden a contactos intrapentaméricos. La mitad A de la CP establece interacciones de naturaleza polar e iónica con los dominios A de subunidades vecinas en el pentámero (A-A5 y A5-A), mientras la mitad B interacciona con los dominios A de subunidades adyacentes (B-A5 y A-B5) tanto a través de

residuos hidrofóbicos como hidrofílicos (Fig 26A y Tablas 7 y 8). Tanto el número como la naturaleza de estas interacciones sugieren que el pentamero podría ser la unidad constitutiva básica en el ensamblaje de la cápsida. Los contactos interpentaméricos vienen dado por interacciones de tipo hidrofóbico que establecen los dominios A y B de la CP con los dominios B de subunidades relacionadas por el eje de simetría de orden 3 (A-B3, A3-B, B-B3, B3-B) y por la interacción de residuos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos de las subunidades A relacionadas por el eje de simetría de orden 2 (A-A2, A2-A) (Fig. 26A y 27; Tablas 7 y 8).



**Figura 27. Interacciones intermoleculares en el eje de simetría de orden dos.** Se muestra la interacción A-A2 correspondiente al recuadro superior de la Fig. 26A con el modelo atómico de dos subunidades (rojo y verde) superpuesto a mapa de densidad de criome. Se observa la presencia de seis Phe, provenientes 3 a 3 (F116, F466 y F486) de dos subunidades diferentes, que forman una interacción hidrofóbica no local o *cluster* hidrofóbico. Es posible visualizar la densidad de criome correspondiente a cadenas laterales de seis Phe así como la de otros cuatro residuos voluminosos presentes en la zona (E118 y E487 de las dos subunidades).

**Tabla 6. Interacciones entre los dominios de la CP de PcV**

Aa	SSE <sup>1</sup>	Res	SSE	Tipo <sup>2</sup>	Aa	SSE	Res	SSE	Tipo
R36	$\alpha 1$	E810	$\alpha 27-\alpha 28$	I	P90	A3- $\beta 1$	V753	$\beta 19$	H
E47	$\alpha 2$	W821	$\alpha 27-\alpha 28$	P	P90	A3- $\beta 1$	A825	$\alpha 27-\alpha 28$	H
A48	$\alpha 2$	P829	$\alpha 27-\alpha 28$	H	P90	A3- $\beta 1$	L846	$\alpha 28-\alpha 29$	H
A48	$\alpha 2$	V830	$\alpha 27-\alpha 28$	H	D93	A3- $\beta 1$	R554	$\beta 14-\alpha 19$	I
R49	$\alpha 2$	D824	$\alpha 27-\alpha 28$	I	G309	$\beta 9-\alpha 10$	E586	$\alpha 19-\alpha 20$	H
Q105	$\beta 1$	D824	$\alpha 27-\alpha 28$	P	L310	$\alpha 10$	I645	$\alpha 22$	H
R75	$\alpha 3$	N559	$\beta 14-\alpha 19$	P	Y312	$\alpha 10$	L589	$\alpha 20$	H
R75	$\alpha 3$	T561	$\beta 14-\alpha 19$	P	L316	$\alpha 10$	P588	$\alpha 20$	H
I77	$\alpha 3$	F558	$\beta 14-\alpha 19$	H	L316	$\alpha 10$	L589	$\alpha 20$	H
M87	$\alpha 3-\beta 1$	A825	$\alpha 27-\alpha 28$	H	T317	$\alpha 10$	P588	$\alpha 20$	H
M87	$\alpha 3-\beta 1$	G826	$\alpha 27-\alpha 28$	H	Q366	$\alpha 12-\alpha 13$	N563	$\beta 14-\alpha 19$	P
G117	$\beta 1-\beta 2$	L817	$\alpha 27-\alpha 28$	H	N367	$\alpha 12-\alpha 13$	N563	$\beta 14-\alpha 19$	P
T120	$\beta 1-\beta 2$	R818	$\alpha 27-\alpha 28$	P	S368	$\alpha 12-\alpha 13$	N563	$\beta 14-\alpha 19$	P
R374	$\alpha 12-\alpha 13$	D557	$\beta 14-\alpha 19$	I	G372	$\alpha 12-\alpha 13$	F558	$\beta 14-\alpha 19$	H
D378	$\alpha 12-\alpha 13$	R554	$\beta 14-\alpha 19$	I	A373	$\alpha 12-\alpha 13$	F558	$\beta 14-\alpha 19$	H
K492	$\beta 11$	D824	$\alpha 27-\alpha 28$	P	L379	$\alpha 12-\alpha 13$	C556	$\beta 14-\alpha 19$	H

<sup>1</sup> SSE al que pertenece. Si es un *loop* se representa como, por ejemplo,  $\alpha 3-\beta 1$ .

<sup>2</sup> Tipo de interacción: P: polar, I: Iónica, H: Hidrofóbica.

**Tabla 7. Interacciones entre las subunidades de la cápsida de PcV**

A-A2					A-B3				
Aa	SSE <sup>2</sup>	Aa	SSE	Tipo <sup>3</sup>	Aa	SSE <sup>2</sup>	Aa	SSE	Tipo <sup>3</sup>
Y7	Nter- $\alpha$ 1	Q405	$\alpha$ 13- $\alpha$ 14	P	M1	Nter- $\alpha$ 1	R511	$\beta$ 11- $\beta$ 12	H
G8	Nter- $\alpha$ 1	P412	$\alpha$ 14	H	A3	Nter- $\alpha$ 1	I513	$\beta$ 11- $\beta$ 12	H
H26	Nter- $\alpha$ 1	S406	$\alpha$ 13- $\alpha$ 14	P	A3	Nter- $\alpha$ 1	L619	A21	H
K28	Nter- $\alpha$ 1	D474	$\alpha$ 18- $\beta$ 11	I	P4	Nter- $\alpha$ 1	I513	$\beta$ 11- $\beta$ 12	H
K29	$\alpha$ 1	E467	$\alpha$ 18	I	V5	Nter- $\alpha$ 1	I709	A24	H
V31	$\alpha$ 1	M404	$\alpha$ 13- $\alpha$ 14	H	L6	Nter- $\alpha$ 1	I709	A24	H
V31	$\alpha$ 1	Y457	$\alpha$ 16- $\alpha$ 17	H	Y7	Nter- $\alpha$ 1	I709	A24	H
F116	$\beta$ 1- $\beta$ 2	F486	$\alpha$ 18- $\beta$ 11	H	T15	Nter- $\alpha$ 1	R782	$\beta$ 20- $\alpha$ 32	P
					M20	Nter- $\alpha$ 1	I515	$\beta$ 11- $\beta$ 12	H
B-B3					A-B5				
Aa	SSE <sup>2</sup>	Aa	SSE	Tipo <sup>3</sup>	Aa	SSE <sup>2</sup>	Aa	SSE	Tipo <sup>3</sup>
I515	$\beta$ 11- $\beta$ 12	F927	$\alpha$ 30- $\alpha$ 31	H	R64	$\alpha$ 2- $\alpha$ 3	E774	$\alpha$ 19	I
T526	$\beta$ 12	V936	$\alpha$ 31	H	K137	$\beta$ 3	Q698	$\beta$ 17- $\beta$ 18	P
T526	$\beta$ 12	M937	$\alpha$ 31	H	A140	$\beta$ 3- $\alpha$ 4	G575	$\alpha$ 19	H
D535	$\beta$ 13	R933	$\alpha$ 31	I	A140	$\beta$ 3- $\alpha$ 4	I765	$\beta$ 19- $\alpha$ 27	H
G890	$\alpha$ 29- $\alpha$ 30	L964	$\beta$ 20- $\alpha$ 32	H	G141	$\beta$ 3- $\alpha$ 4	I765	$\beta$ 19- $\alpha$ 27	H
F927	$\alpha$ 30- $\alpha$ 31	A956	$\beta$ 20- $\alpha$ 32	H	L143	$\beta$ 3- $\alpha$ 4	A571	$\alpha$ 19	H
A-A5					Q194	$\alpha$ 6	R582	$\alpha$ 19- $\alpha$ 20	P
Aa	SSE <sup>2</sup>	Aa	SSE	Tipo <sup>3</sup>	T197	$\alpha$ 6	A571	$\alpha$ 19	H
R149	$\beta$ 3- $\alpha$ 4	E158	$\beta$ 3- $\alpha$ 4	H	Y242	$\alpha$ 8	R581	$\alpha$ 19- $\alpha$ 20	P
N162	$\beta$ 3- $\alpha$ 4	K168	$\alpha$ 4- $\alpha$ 5	P	P245	$\alpha$ 8- $\beta$ 6	V578	$\alpha$ 19- $\alpha$ 20	H
R163	$\alpha$ 4	N173	$\alpha$ 5	P	G246	$\alpha$ 8- $\beta$ 6	V578	$\alpha$ 19- $\alpha$ 20	H
N164	$\alpha$ 4	K168	$\alpha$ 4- $\alpha$ 5	P	V352	$\beta$ 10	G575	$\alpha$ 19	H
N164	$\alpha$ 4	Q174	$\alpha$ 5	P	S354	$\beta$ 10- $\alpha$ 12	R574	$\alpha$ 19	P
T172	$\alpha$ 4- $\alpha$ 5	M185	$\alpha$ 6	H	Y356	$\alpha$ 12	R574	$\alpha$ 19	P
N173	$\alpha$ 5	Q178	$\alpha$ 5	P	Y356	$\alpha$ 12	K579	$\alpha$ 19- $\alpha$ 20	P
Q174	$\alpha$ 5	Q178	$\alpha$ 5	P	D411	$\alpha$ 13- $\alpha$ 14	R707	$\beta$ 18- $\alpha$ 24	I
D175	$\alpha$ 5	Q178	$\alpha$ 5	P	H414	$\alpha$ 14	D660	$\beta$ 16- $\alpha$ 23	P
D175	$\alpha$ 5	K179	$\alpha$ 5- $\alpha$ 6	I					
D182	$\alpha$ 5- $\alpha$ 6	Q294	$\beta$ 8- $\beta$ 9	P					
N183	$\alpha$ 5- $\alpha$ 6	Q294	$\beta$ 8- $\beta$ 9	P					
M185	$\alpha$ 6	T170	$\alpha$ 4- $\alpha$ 5	H					
D186	$\alpha$ 6	K254	$\beta$ 6- $\alpha$ 9	I					
D186	$\alpha$ 6	Q294	$\beta$ 8- $\beta$ 9	P					

<sup>1</sup> SSE al que pertenece. Si es un *loop* se representa como, por ejemplo,  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5.

<sup>2</sup> Tipo de interacción: P: polar, I: Iónica, H: Hidrofóbica.

Tabla 8. Naturaleza de las interacciones de la CP de PcV

Dominios		Tipo Interacción Dominante
A	B	Mezcla
A	A2	Mezcla
A	A5	Predominantemente Polar/iónico
A	B3	Predominantemente Hidrofóbico
B	B3	Predominantemente Hidrofóbico
A	B5	Mezcla

#### 4.4.3 Interacción RNA-proteína de PcV

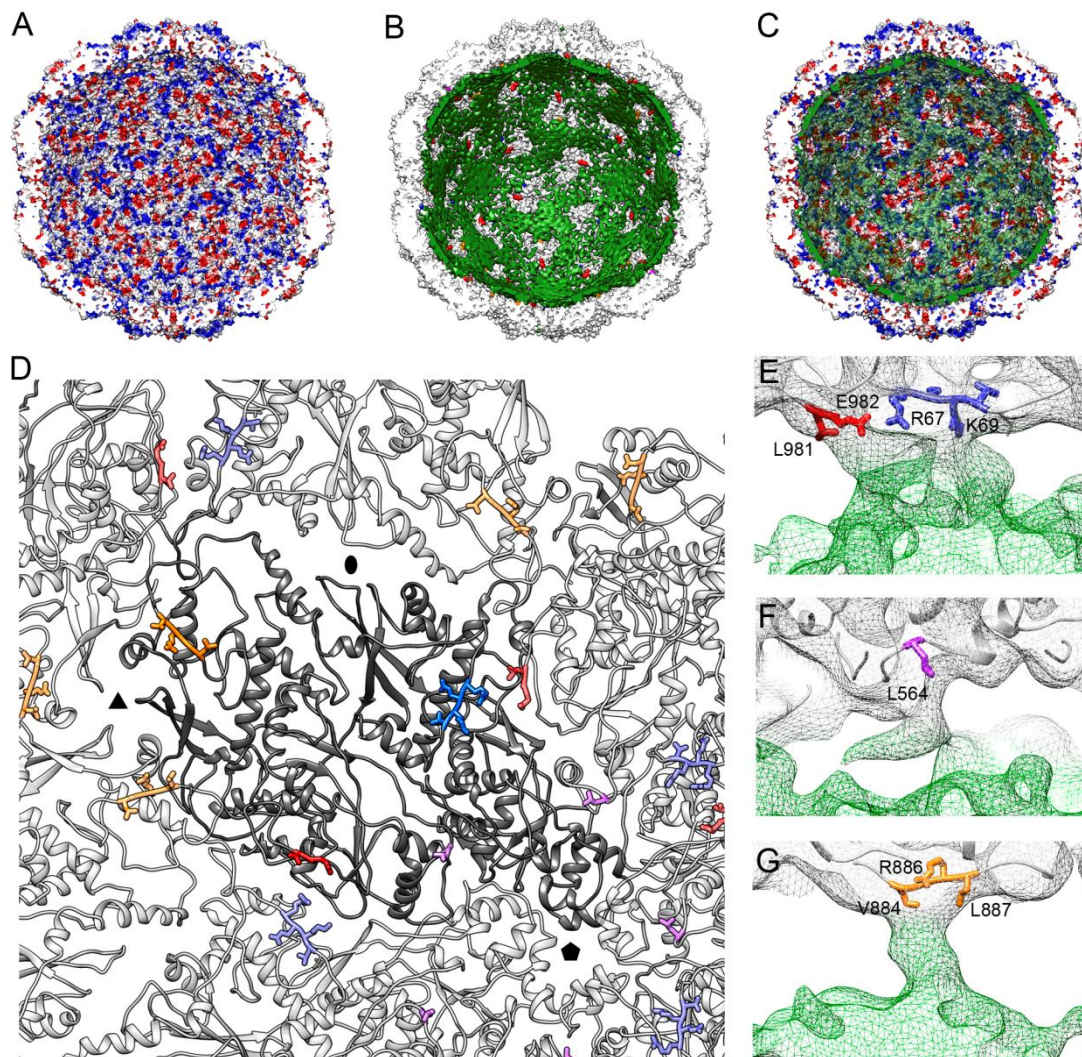
A partir del modelo atómico de la CP de PcV fue calculada la superficie de potencial electrostático de la cápsida completa de PcV (Fig. 28A). La superficie interna de la misma muestra la presencia de canales electropositivos entre los ejes de simetría de orden 5 y 3 que excluyen zonas de naturaleza electronegativa alrededor de los ejes de simetría de orden dos.

El análisis de la densidad de criome de las partículas llenas de PcV muestra una capa de densidad por debajo de la cápsida del virus que se encuentra en estrecho contacto con la misma y podría ser asignada al dsRNA empaquetado en el virión (Fig. 28B y C en verde). Las densidades constituyentes de esta capa tienen forma de aspas que unen los ejes de simetría de orden 3 y 5 y cuyas dimensiones son compatibles con el ancho de una molécula de dsRNA. La superposición de los canales positivos de la superficie de potencial electrostático con la capa de dsRNA muestra una coincidencia casi perfecta entre ambos y sugeriría que estos canales positivos podrían servir como "guía" al dsRNA, de naturaleza electronegativa.

La visualización directa del mapa de criome de partículas llenas de PcV permite identificar 180 puntos de interacción de la cápsida de PcV con el dsRNA subyacente. Estos puntos se corresponden con 3 regiones de interacción equivalentes en las que intervienen 4 regiones diferenciadas de la CP (Fig. 28D-G). Los residuos R67-K69 (Fig. 28D y E, azul) y L981-E982 (Fig. 28D y E, rojo) de una subunidad adyacente intervienen en la primera de interacciones. En la segunda región la interacción viene mediada por la L564 (Fig. 28D y F, violeta) y la tercera implica a los aminoácidos V884-L887 (Fig. 28D y G, naranja). Estas zonas de interacción RNA-proteína se encuentran en registro con las zonas electropositivas antes descritas y con la densidad asignada al dsRNA (Fig. 28B y C) y darían cuenta del estrecho contacto entre el genoma del virión y la cápsida. Además, tal como ha sido descrito en el apartado 4.3.2, las regiones de interacción R67-K69 y V884-L887 preceden a zonas poco resueltas en el mapa de densidad derivado de la mezcla de partículas llenas y vacías de PcV (Fig. 22B y C). Estas regiones aparecen sin embargo resueltas en el mapa derivado únicamente



de las partículas llenas, lo que indica un mayor grado de ordenamiento y sugiere una función de andamiaje del dsRNA genómico.

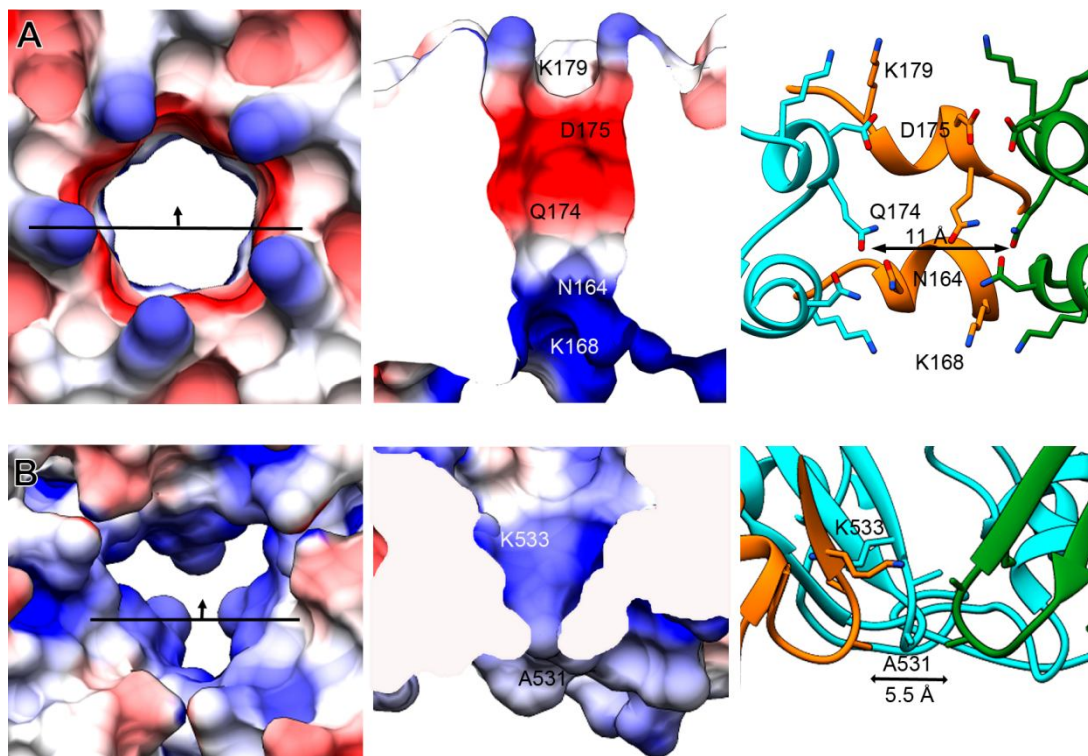


**Figura 28. Interacciones de la CP con el dsRNA de PcV.** (A) Superficie de potencial electrostático de la cápsida de PcV. Se muestra la superficie accesible de la cara interna de la cápsida con su distribución de cargas positivas (azul) y negativas (rojo). (B) Superposición de la densidad correspondiente a la última capa de dsRNA del virión y la superficie accesible de la capa interna de la cápsida. Se indican sobre la superficie los puntos de interacción con el dsRNA (azul, violeta, naranja y rojo). El mapa de densidad de dsRNA se representa en verde, umbralizado a  $1\sigma$ . (C) Superposición de (A) y el mapa de dsRNA representado en (B). (D) Localización de los residuos que interactúan con el dsRNA, coloreados en azul, violeta, naranja y rojo. La subunidad asimétrica está representada en gris oscuro, y las vecinas en gris claro. (E) Vista lateral de la interacción de los residuos R67 - V70 (azul) y L981-E982 (rojo) con el dsRNA. Se muestran los residuos R67 - V70 en azul y L981-E982 en rojo. (F) Vista lateral de la interacción del residuo L564 (violeta) con el dsRNA. (G) Vista lateral de la interacción de los residuos V884-L887 (naranja) y el genoma del virión. El mapa de densidad se muestra umbralizado a  $1\sigma$  con la zona asignada al RNA coloreada en verde.

La inspección de la superficie de la cápsida generada a partir del modelo atómico de la CP de PcV muestra la presencia de dos tipos de poros localizados en los ejes de simetría de orden



cinco y tres (Fig. 29). Los 12 poros pentaméricos presentan un diámetro de 11 Å y una altura de 26 Å. La inspección del potencial electrostático de la superficie interna de estos poros muestra la presencia un anillo electronegativo central (D175) flanqueado por anillos electropositivos en los extremos interior (N164, K168) y exterior (K179) de los mismos (Fig 29A). Los 20 poros presentes los ejes ternarios (Fig. 29B) son de menor tamaño (5.5 Å entre las A531 localizadas en las paredes del poro) y presentan una superficie de potencial electrostático esencialmente positiva. Aunque el tamaño de los poros quinarios (11 Å) es inferior al requerido para ser compatible con el paso de un ssRNA, un cambio en la posición de las cadenas laterales de los residuos presentes en las paredes del canal permitiría el paso de éstas moléculas. Esta posibilidad junto con su naturaleza electrostática, podría postularlos como posible punto de salida al citoplasma de los transcritos generados por la RNA polimerasa RNA dependiente en el interior de la cápsida del virión.



**Figura 29. Análisis de los canales de la cápsida de PcV.** (A) Canal localizado en el eje de simetría de orden cinco. Izquierda: vista superior de la superficie accesible con su distribución de cargas positivas (azul) y negativas (rojo). La línea indica el plano de corte la imagen central y la flecha la dirección de visualización de la misma. Centro: vista lateral del poro representado. Se indican los residuos cargados que constituyen las paredes del poro. Derecha: representación del modelo atómico. Se muestran las cadenas laterales de los residuos cargados que constituyen las paredes del poro. (B) Canal localizado en el eje de simetría de orden tres. Se muestran paneles equivalentes a los del apartado (A). Además de los residuos cargados, se muestra el aminoácido A531 localizado en el punto de menor diámetro del poro.

#### 4.4.4 Ajuste del modelo atómico de la CP de PcV en el mapa de criome de CnCV1

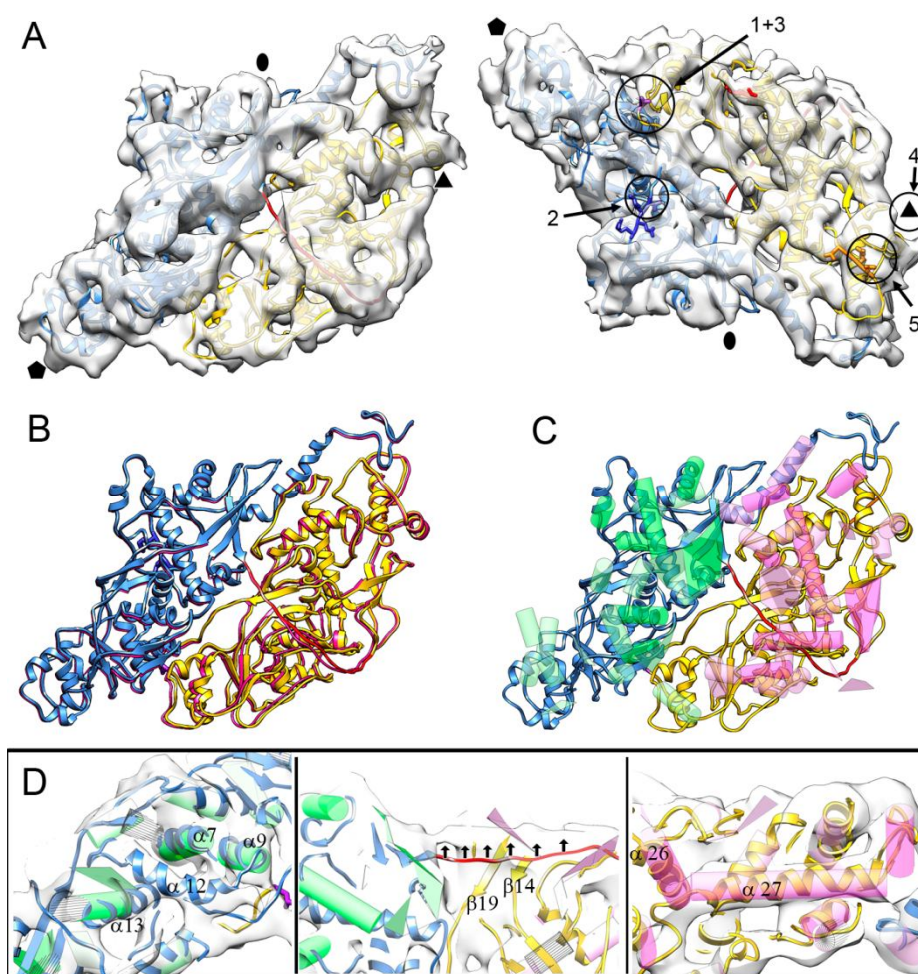
Una vez obtenido el modelo atómico de la CP de PcV, su homología estructural con la CP CnCV1 fue caracterizada mediante el ajuste de la estructura atómica de PcV en el mapa de densidades de CnCV1 y la comparación directa de los SSE del modelo atómico y los predichos para la CP de CnCV1 a partir de la 3DR a resolución subnanométrica (apartado 4.1.3) (Fig. 30).

El ajuste inicial del modelo atómico de la CP de PcV en el mapa de criome de CnCV1 fue realizado considerando la proteína completa como un único cuerpo rígido. Posteriormente, la posición de las mitades A y B de la CP de PcV fue refinada considerando cada uno de estos dominios como un cuerpo rígido independiente. Aunque el resultado es muy similar en ambas aproximaciones, el ajuste independiente de ambos dominios permite una mejor superposición de las coordenadas atómicas en el mapa de criome mediante un pequeño desplazamiento del dominio B respecto al A, que permanece estático (Fig. 30A y B).

La comparación directa entre los SSE predichos a partir de la densidad de criome de la cápsida de CnCV1 a  $\sim 8$  Å de resolución y los presentes en el modelo atómico de la CP de PcV muestra un alto grado de identidad entre ambos (Fig. 30C-D). De las 38 hélices  $\alpha$  y 12 láminas  $\beta$  modeladas sobre la densidad de criome de CnCV1, 20 hélices  $\alpha$  y 5 láminas  $\beta$  son superponibles con las 33 hélices  $\alpha$  y 7 láminas  $\beta$  presentes en la CP de PcV. Además, la evaluación de las densidades de criome de la CP de CnCV1 en base al modelo atómico de PcV permite identificar la presencia de 3 hélices  $\alpha$  (hélices  $\alpha_{12}$ ,  $\alpha_{24}$  y  $\alpha_{30}$ ) que previamente no habían sido asignadas dado su pequeño tamaño y los  $\sim 8$  Å de resolución del mapa de criome (Fig. 30D izquierda). Los dos dominios constituyentes de CP de PcV están unidos mediante el lazo de 16 aminoácidos que conecta ambas mitades y queda expuesto en la superficie externa de la cápsida. El análisis del ajuste de las coordenadas atómicas de PcV en la 3DR de CnCV1 muestra la presencia de una densidad electrónica no asignada junto al lazo de unión, por lo que sólo haría falta una pequeña traslación para ajustar ambos elementos (Fig. 30D centro).

La comparación directa de las zonas de interacción de las cápsidas de PcV (apartado 4.4.3) y CnCV1 (apartado 4.1.6) con dsRNA subyacente muestra una coincidencia casi perfecta entre ambas (Fig. 30A). Teniendo en cuenta las relaciones de simetría, las interacciones 1 y 3 de CnCV1 se corresponden al punto de interacción definido por el residuo L564 de PcV. Las regiones dos y cinco colocalizan con los puntos R67-R69 + L981-E982 y V884-L887, respectivamente. Además de estas tres regiones de interacción, comunes entre ambos virus, la

cápsida de CnCV1 presenta un punto adicional de interacción (zona 4), localizado en el eje de simetría de orden 3, que no está presente en la cápsida de PcV.



**Figura 30. Homología estructural de las CP de PcV y CnCV1.** (A) Vista superior (izquierda) e inferior (derecha) del ajuste del modelo atómico de la CP PcV en el mapa de densidades de crioME de la subunidad asimétrica de CnCV1. Las zonas de interacción de la CP de CnCV1 con el RNA se indican con círculos negros y su nomenclatura se corresponde a la definida en la figura 14. Los residuos que interaccionan con el RNA definidos para PcV están resaltados en colores azul, violeta, naranja y rojo. Los ejes de simetría se indican con figuras geométricas. (B) Comparación del ajuste realizado considerando toda la CP de PcV como un cuerpo rígido (rosa) y el posterior ajuste considerando cada dominio como un cuerpo rígido independiente (dominio A, azul; dominio B, amarillo, lazo de unión, rojo). (C) Comparación del modelo atómico de PcV (diagrama de cintas con dominio A en azul; dominio B en amarillo y lazo de unión, rojo) con los SSE predichos a partir del mapa de densidad de CnCV1 (cilindros y planos verdes para la mitad A de la CP y rosas para la mitad B). (D) Evaluación del mapa de densidades en base al ajuste del modelo atómico de PcV en el mapa de densidades de CnCV1. Izquierda: Detalle de la hélice  $\alpha 12$  no asignada mediante predicción de SSE pero cuya densidad es identificada con el modelo atómico. Centro: Densidad electrónica asignada al lazo de unión de los dominios A y B. Las flechas indican la traslación necesaria para ajustar el lazo de unión a la densidad. Derecha: zona característica de superposición de los SSE predichos a partir de la 3DR de la cápsida de CnCV1 y el modelo atómico de la CP PcV ajustada.

#### 4.4.5 Duplicación estructural de la CP de la cápsida de PcV

Con el fin de determinar la homología estructural entre las mitades N- y C-terminal de la CP de PcV los dominios A (1-498) y B (516-982) de la proteína fueron superpuestos. El alineamiento estructural con el programa DALI (Hasegawa & Holm, 2009) muestra un alto índice de calidad o *z-score* de 12.2 para la superposición de 316 C $\alpha$ , con un rmsd de 4.4 Å, entre ambas mitades (Fig.31). Los residuos superpuestos se localizan en las regiones D98-R425 y L487-R498 de la mitad A; y P521-N838 y S945-C955 de la mitad B. Este ajuste revela un plegamiento común a ambas mitades en el que se superponen 9 hélices  $\alpha$  (A-B:  $\alpha 4$ - $\alpha 19$ ,  $\alpha 6$ - $\alpha 20$ ,  $\alpha 7$ - $\alpha 21$ ,  $\alpha 8$ - $\alpha 22$ ,  $\alpha 9$ - $\alpha 23$ ,  $\alpha 10$ - $\alpha 24$ ,  $\alpha 11$ - $\alpha 26$ ,  $\alpha 13$ - $\alpha 26$ ,  $\alpha 15$ - $\alpha 28$ ) y 9 cadenas  $\beta$  (A-B:  $\beta 1$ - $\beta 12$ ,  $\beta 2$ - $\beta 13$ ,  $\beta 3$ - $\beta 14$ ,  $\beta 5$ - $\beta 15$ ,  $\beta 6$ - $\beta 16$ ,  $\beta 7$ - $\beta 17$ ,  $\beta 8$ - $\beta 18$ ,  $\beta 10$ - $\beta 19$ ,  $\beta 11$ - $\beta 20$ ) (Fig. 31C). Este núcleo se localiza en ambos dominios en la región más cercana al eje de simetría de orden 5 (Fig 31A) y corresponde a una única secuencia aminoacídica continua (A: D98-R425, B: P521-N838) que contiene todos estos SSE a excepción las cadenas  $\beta 11$  y  $\beta 20$  de las mitades A y B, respectivamente (Fig. 31C). A pesar de que la similitud global entre las secuencias de ambas mitades es baja, los SSE conservados presentan un mayor grado de identidad y similitud entre residuos alineados (Fig. 31C).

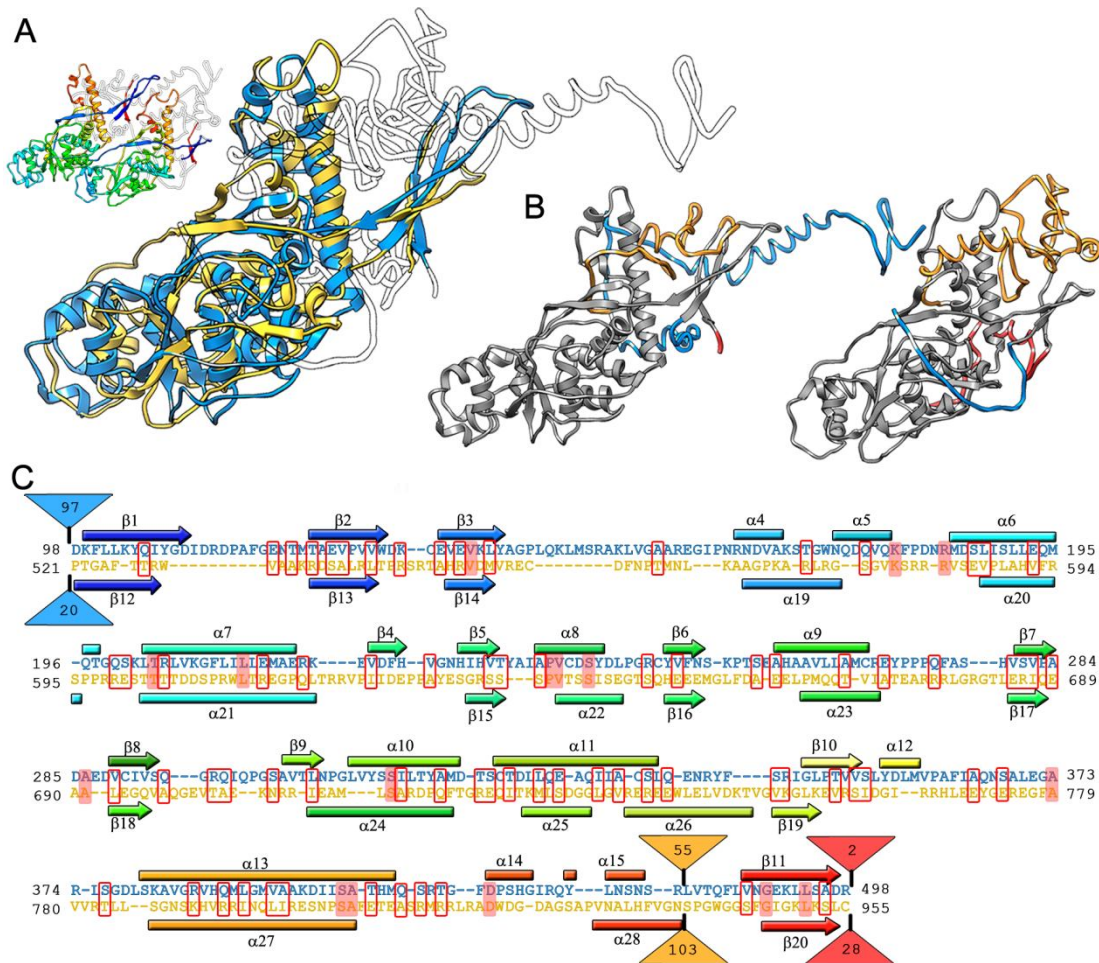
Las zonas no alineadas estructuralmente se corresponden a tres únicos puntos en la secuencia coincidentes en ambos dominios (Fig 31B y C): (1) la región N-terminal que corresponde al extremo amino absoluto de la CP en la mitad A (97 aa, azul) y al lazo de unión entre ambos dominios en la mitad B (20 aa, azul); (2) la región precedente a la última lámina  $\beta$  ( $\beta 11$  y  $\beta 20$ ) de cada dominio (A: 55 aa, B: 103 aa, naranja); y (3) la zona C-terminal que corresponde a la región del lazo de unión entre dominios en la mitad A (2 aa, rojo) y C-terminal absoluto de la CP para la mitad B (28 aa, azul). Estos resultados indican que ambas mitades de la CP de PcV contienen una duplicación casi perfecta de un único dominio, que presenta un único sitio preferencial para la inserción de secuencias además de sus extremos N- y C-terminal.

#### 4.4.6 Homología estructural de los dominios duplicados de PcV en la CP del virus L-A

Las dos mitades de la CP de PcV generan una arquitectura que se asemeja a las cápsidas T=2 formadas por 120 proteínas de totivirus y reovirus. Cada una de estas mitades contiene un dominio conservado que podría ser un vestigio de un plegamiento ancestral a partir del cual han evolucionado las estructuras de las proteínas de los virus dsRNA actuales. En este contexto el dominio conservado entre las mitades de la CP de PcV fue comparado con la proteína Gag del virus L-A dado que: (1) ambos virus infectan células eucariotas inferiores y carecen de ciclo extracelular; (2) el análisis de sus RpRd indica que están más estrechamente relacionados entre sí que con otros micovirus dsRNA como los partitivirus (Ghabrial &



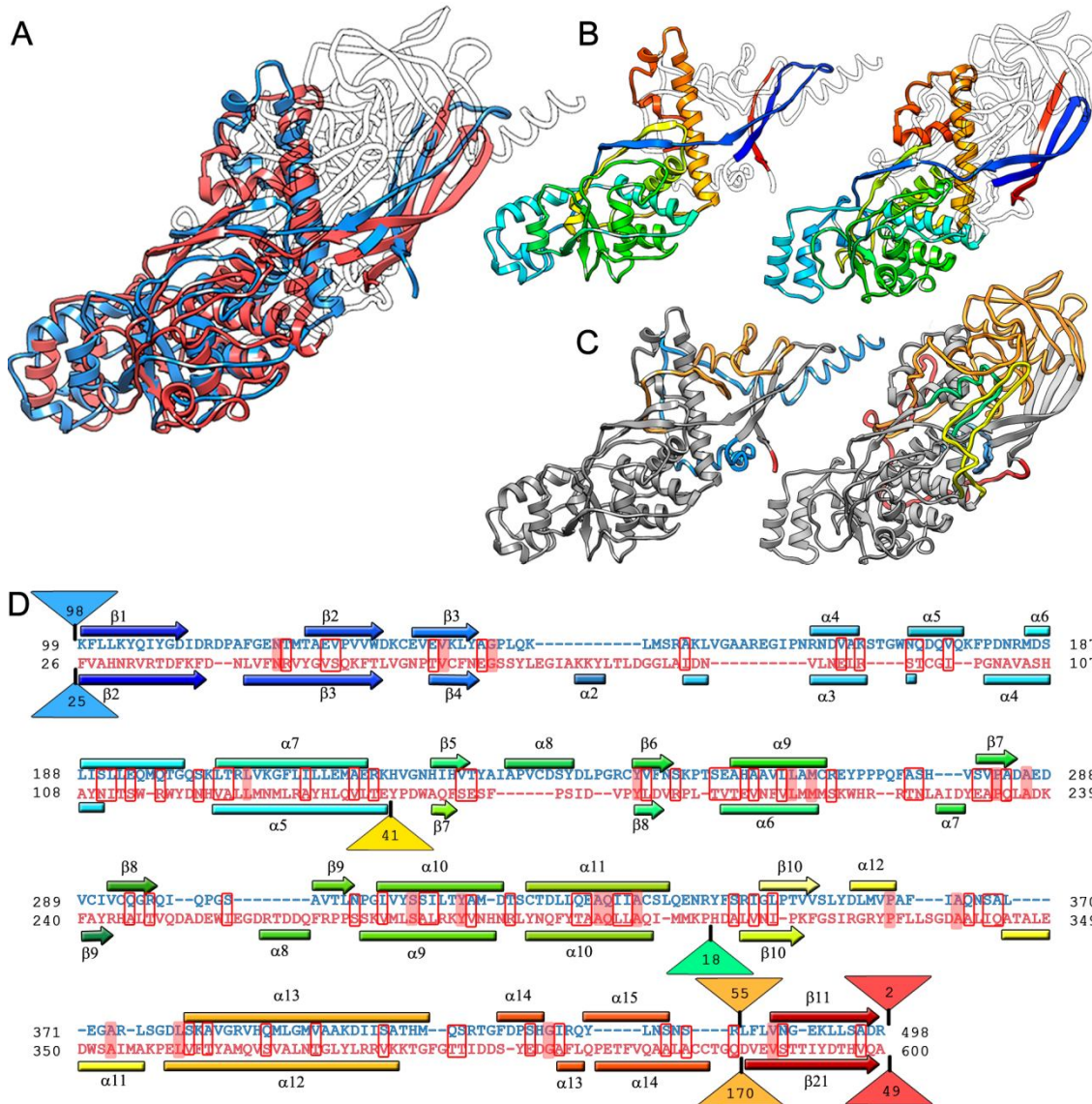
Castón, 2012); (3) presentan cápsidas con superficies rugosas en contraste con las lisas nucleocápsidas de los reovirus, que están rodeadas de cápsidas más externas.



**Figura 31. Duplicación estructural de los dominios de la CP de PcV** (A) Alineamiento estructural de los dominios A (D98-R425 y L487-R498, azul) y B (y P521-N838 y S945-C955, amarillo). Las zonas en blanco corresponden a regiones que no superponen entre ambas mitades. La miniatura (arriba-izquierda) muestra la estructura atómica de la CP (blanco) sobre la que se muestra el plegamiento común a ambas mitades coloreados de N-terminal (azul) a C-terminal (rojo). (B) Regiones no superpuestas entre ambos dominios. Se muestra en gris el plegamiento común a las mitades A (izquierda) y B (derecha) sobre la que se muestran las regiones no alineadas en azul (N-terminal), naranja (intermedio) y rojo (C-terminal). (C) Alineamiento de las secuencias de las mitades A (letras en azul, arriba) y B (letras en amarillo, abajo) tras el alineamiento estructural de ambas con DALI. Las hélices  $\alpha$  y cadenas  $\beta$  se ilustran como rectángulos y flechas, respectivamente, coloreados en esquema arco iris de N- a C-terminal. Los triángulos de colores representan regiones no alineadas (inserciones) sobre los que se indica el número de residuos que las componen. Los recuadros sobre la secuencia indican residuos similitud (borde rojo) o identidad (relleno en rojo).

El alineamiento estructural de la proteína Gag de L-A con el dominio conservado de la CP de PcV mediante el programa DALI (Fig 32) tiene como resultado la superposición de 288 C $\alpha$  con un rmsd de 5.0 Å y un índice de calidad o *z-score* de 14.8 (Hasegawa & Holm, 2009).

El dominio conservado de las mitades A (D98-R425 y L487-R498) y B (P521-N838 y S45-C955) se superpone con las regiones F26-E138, Y183-P303, H323-Q416 y D586-A600 de Gag. Este ajuste muestra la superposición de 8 hélices  $\alpha$  (PcVA-PcVB-Gag:  $\alpha 4$ - $\alpha 19$ - $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ - $\alpha 20$ - $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$ - $\alpha 21$ - $\alpha 5$ ,  $\alpha 9$ - $\alpha 23$ - $\alpha 6$ ,  $\alpha 10$ - $\alpha 24$ - $\alpha 9$ ,  $\alpha 11$ - $\alpha 26$ - $\alpha 10$ ,  $\alpha 13$ - $\alpha 26$ - $\alpha 12$ ,  $\alpha 15$ - $\alpha 28$ - $\alpha 14$ ) y 8 cadenas  $\beta$  (PcVA-PcVB-Gag:  $\beta 1$ - $\beta 12$ - $\beta 2$ ,  $\beta 2$ - $\beta 13$ - $\beta 3$ ,  $\beta 3$ - $\beta 14$ - $\beta 4$ ,  $\beta 5$ - $\beta 15$ - $\beta 7$ ,  $\beta 6$ - $\beta 16$ - $\beta 8$ ,  $\beta 8$ - $\beta 18$ - $\beta 9$ ,  $\beta 10$ - $\beta 19$ - $\beta 10$ ,  $\beta 11$ - $\beta 20$ - $\beta 21$ ) (Fig 32C). Al igual que en las mitades de la CP de PcV, la región homóloga en Gag se localiza en la zona más cercana al eje de simetría de orden 5 mientras que los elementos no alineados se encuentran distales al mismo (Fig. 32B).



**Figura 32. Homología estructural de los dominios duplicados de PcV con la CP de L-A.** (A) Alineamiento estructural del dominio A de PcV (D98-R425 y L487-R498, azul) y L-A (F26-E138, Y183-P300, H316-Q416 y D586-A600, Rojo). Las zonas en blanco corresponden a regiones que no superponen entre ambas mitades. El dominio A está representado ocultando los primeros 36 residuos. (B) Plegamiento estructural común entre la mitad A de PcV (izquierda) y L-A (derecha) coloreados en

esquema arcoiris de N-terminal (azul) a C-terminal (rojo). (C) Regiones no superpuestas. Se muestra en gris el plegamiento común a la mitad A de PcV (izquierda) y L-A (derecha) sobre la que se muestran las regiones no alineadas en azul (N-terminal), amarillo(aa 139-182), verde (aa 304-322), naranja (intermedio) y rojo (C-terminal). (D) Alineamiento de las secuencias de la mitad A de PcV (letras en azul, arriba) y L-A (letras en rojo, abajo) tras el alineamiento estructural de ambas con DALI. Las hélices  $\alpha$  y cadenas  $\beta$  se ilustran como rectángulos y flechas, respectivamente, coloreados en esquema arco iris de N- a C-terminal. Los triángulos de colores representan regiones no alineadas (inserciones) sobre los que se indica el número de residuos que las componen. Los recuadros sobre la secuencia indican residuos similitud (borde rojo) o identidad (relleno en rojo).

El análisis topológico del plegamiento de Gag estructuralmente homólogo al dominio duplicado de la CP de PcV revela que, además de los puntos de inserción N-terminal, C-terminal y precedente a la cadena  $\beta$ 21 (cadenas  $\beta$  11 y  $\beta$ 20 en las mitades A y B de la CP de PcV), L-A presenta otros dos puntos de inserción (Fig. 32C y D): (1) el péptido Q139-S182 (41 aa, amarillo), donde además se localiza la actividad de *decapping* asociada a Gag; (2) el péptido M301-A318 (18 aa, verde). Aunque estos cinco puntos de inserción corresponden a diferentes regiones de la secuencia de Gag presentan una disposición cercana en su estructura tridimensional (Fig. 32B). En conjunto, estos resultados indican que el plegamiento común a los dos dominios de la CP de PcV está preservado en la proteína Gag de L-A y que esta última presenta tanto las zonas preferenciales de inserción de PcV como otras dos adicionales para la adquisición de variaciones estructurales y funcionales.





## ***5. Discusión***



## 5.1 Arquitectura de la cápsida T=2

La cápsida T=1 con 120 subunidades representa una arquitectura peculiar pero común entre las cápsidas que rodean el genoma de la mayoría de los virus dsRNA, independientemente del huésped que infectan, sea eucariota o procariota (no se han descrito virus dsRNA en arqueas). Las cápsidas de PcV y CnCV1 son atípicas en el sentido de que están formadas por 60 monómeros en lugar de 60 dímeros asimétricos (Luque et al., 2010; Gómez-Blanco et al., 2012). Nuestros análisis indican que la CP de los chrysovirus está formada por dos estructuras elongadas que pueden ser concebidas como el resultado de la duplicación de un dominio, aunque no se detecta una similitud significativa entre sus secuencias. Muchos de los SSE de cada dominio presentan una disposición similar ya que mediante una simple traslación quedan parcial o completamente superpuestos. La organización de la cápsida de los chrysovirus es claramente reminiscente de las cápsidas T=1 de reovirus y totivirus, en las que las CP están dispuestas como dímeros paralelos (Reinisch et al., 2000). Nuestros resultados reconcilian las características estructurales de la cápsida T=1 con una duplicación estructural de los chrysovirus con la cápsida T=1 con un dímero como unidad asimétrica de la mayoría de los virus dsRNA, una característica conservada que proporciona un marco óptimo para el metabolismo eficiente del dsRNA viral. La determinación del modelo atómico de la cápsida de PcV a partir de imágenes de crioME demuestra definitivamente que el plegamiento de la CP es una característica distintiva preservada en la mayoría de los virus dsRNA. Un análisis detallado de la CP de PcV indica que es una duplicación casi perfecta de un único dominio, en el que la mayoría de las hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$  de una mitad se solapan con las de la otra. Ambos dominios o plegamientos presentan, además de sus extremos amino y carboxilo, un único sitio preferencial para la inserción de nuevos segmentos peptídicos que les permite la posibilidad de adquirir variaciones estructurales y funcionales.

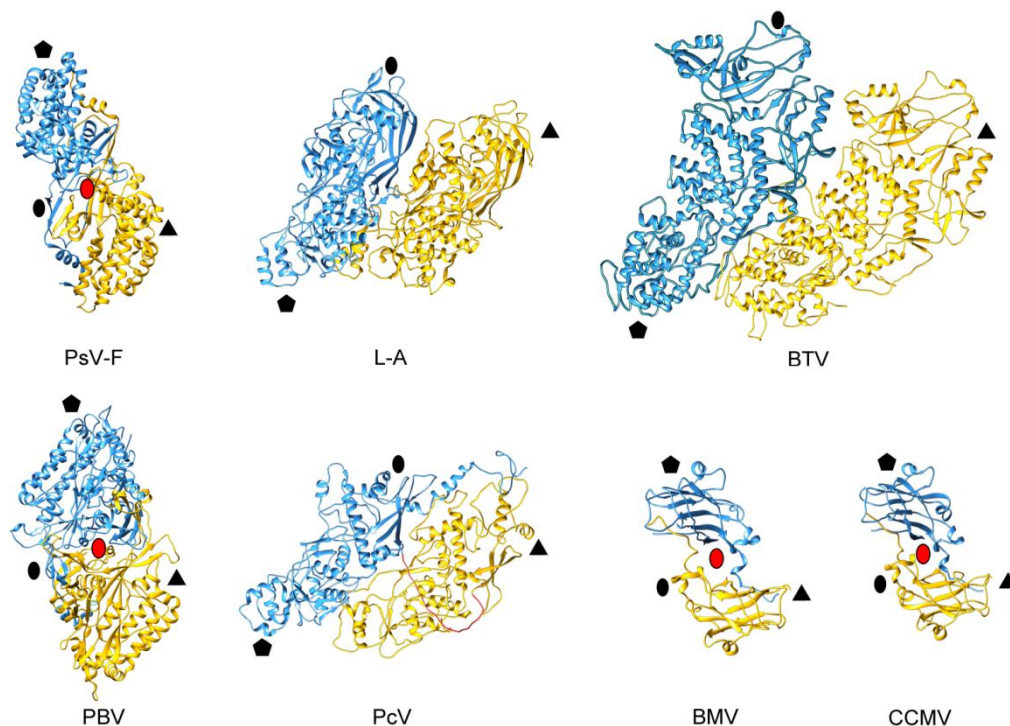
Los chrysovirus, totivirus y reovirus presentan una organización similar, con una unidad estructural constituida por dímeros asimétricos en los que cada subunidad o confórmero A y B (o mitad proteica en el caso de los chrysovirus) están orientados de forma paralela con numerosos contactos laterales (Fig. 33). Aunque las subunidades A y B tienen un plegamiento similar, éstas muestran diferencias en sus estructuras secundarias y en algunos ángulos “bisagra”, debido a las distintas interacciones (no equivalentes) que mantienen con las subunidades adyacentes. Las CP de totivirus y reovirus son relativamente grandes (>60 kDa). Por otra parte, los partitivirus y picobirnavirus tienen CP relativamente pequeñas (~420 residuos) con una organización cuaternaria distinta (Duquerroy et al., 2009a; Pan et al., 2009), ya que el dímero de la CP tiene un eje local casi perfecto de simetría de orden dos (Fig. 33). Los dímeros de CP están estabilizados por regiones intercambiadas entre las subunidades (*molecular swapping*), típico de virus ssRNA (Qu et al., 2000). La organización de los

cistovirus es intermedia entre ambas clases de dímeros, aunque más similar a la de los picobirnavirus y partitivirus. Los bromovirus (por ejemplo, *Brome mosaic virus* y *Cowpea chlorotic mottle virus*), un grupo de virus ssRNA de plantas, presentan cápsidas cuasiequivalentes T=3 y la CP, basada en el clásico barril  $\beta$ , puede ensamblarse *in vitro* en cápsidas T=2 en ciertas condiciones (Krol et al., 1999; Tang et al., 2006). Estas cápsidas de 120 subunidades utilizan muchas de las interacciones de las cápsidas T=3 de 180 subunidades además de nuevas interacciones no equivalentes que no son aparentes en los viriones maduros (Fig. 33). Las subunidades A y B son mas similares entre sí que las de los virus dsRNA que adoptan conformaciones mas diferentes. La posibilidad de que una misma CP pueda ensamblarse en distintas cápsidas utilizando interacciones alternativas implica que las barreras evolutivas entre las distintas cápsidas icosaédricas son reducidas.

El sándwich  $\beta$ , un barril  $\beta$  que consta de ocho cadenas  $\beta$  (con dos láminas  $\beta$ , BIDG y CHEF), es el plegamiento más extendido entre las CP de los virus esféricos (Rossmann & Johnson, 1989). Debido en parte a su flexibilidad intrínseca (por ejemplo, mediante inserciones de distinto tamaño entre las cadenas  $\beta$ ), las CP basadas en este barril  $\beta$  pueden ensamblarse en cápsidas icosaédricas con tamaño muy variable (incrementando T), mientras que las CP con un motivo basado en el plegamiento de PcV están restringidas a cápsidas icosaédricas T=1y el tamaño de la cápsida está determinado únicamente por el tamaño de la CP. El motivo rico en hélices  $\alpha$  determinado en PcV, observado solamente en las CP de las cápsidas T=1 de los virus dsRNA, representa probablemente un “mínimo local”, atrapado durante la evolución en una etapa subóptimas para el ensamblaje de la cápsida, mientras que el dominio del sándwich  $\beta$ , muy extendido entre numerosos virus estéricos, parece más próximo a la conformación más apropiada (“mínimo evolutivo final”).

Las dos tendencias establecidas entre las CP de los virus dsRNA, dímeros paralelos o dímeros cuasi-simétricos, tienen importantes consecuencias en el proceso de ensamblaje de la cápsida. Los virus del grupo de los reovirus, totivirus y chrysovirus probablemente comienzan su ensamblaje a partir de la nucleación de pentámeros de dímeros, mientras que las cápsidas de los partitivirus y picornavirus son ensambladas a partir de intermediarios constituidos por dímeros de dímeros de la CP (Pan et al., 2009). La CP del P1 del bacteriófago dsRNA  $\phi 8$  (denominada P1), que pertenece a los cistovirus, forma tetrámeros solubles en un sistema de ensamblaje *in vitro* (Kainov et al., 2003; Poranen & Bamford, 2012).

La fusión de dominios en CP de virus icosaédricos ha sido descrita previamente en el capsómero trimérico de los adenovirus, denominado hexón (Roberts et al., 1986), donde cada monómero está formado por dos dominios muy similares de barril  $\beta$  (o  $\beta$  sandwich). Otros virus



**Figura 33. Comparación de los dímeros de las cápsidas T=2 de virus dsRNA y virus ssRNA.** Los diagramas muestran las moléculas (o mitades para PcV) A y B en azul y amarillo, respectivamente, vistos desde la superficie externa de la cápsida. PsV-F, partitivirus de *Penicillium stoloniferum* (PDB, 3es5); L-A, totivirus L-A (1m1c); BTV, orbivirus de la lengua azul (2btv); PBV, picobirnavirus (2vf1); PcV, chrysovirus de *Penicillium chrysogenum* (3j3i); BMV, *Brome mosaic virus* (1js9); CCMV, *Cowpea chlorotic mottle virus* (1cwp). Los ejes de simetría icosaédrica de orden 5, 3 y 2 se indican por símbolos negros. Los dímeros de PsV-F, PBV, BMV y CCMV están relacionados por un eje de simetría local de orden 2 casi perfecto.

complejos de dsDNA tienen capsómeros triméricos similares, como el virus PBCV-1 (*Paramecium bursaria chlorella virus 1*) que infecta algas verdes unicelulares de las especies *Chlorella* (Nandhagopal et al., 2002), y el bacteriófago PRD1 (Abrescia et al., 2004) de *Salmonella enterica*. La subunidad mayor de los comovirus, un grupo de virus de plantas de ssRNA, también está formada por la fusión de dos dominios de barril  $\beta$  (Lomonosoff & Johnson, 1991). De igual modo que en las dos mitades de la CP de PcV, estos motivos o plegamientos fusionados carecen de una similitud de secuencia.

## 5.2 El linaje de los virus dsRNA: implicaciones evolutivas

Los primeros análisis basados únicamente en la secuencia de la CP de PcV sugerían vagamente que consta de dos mitades aproximadamente similares con segmentos conservados, pero la importancia de estos análisis no era clara ya que se introducían numerosas interrupciones (Caston et al., 2003). Aunque las proteínas estructurales de los virus suelen mostrar una similitud de secuencia muy baja, cada vez hay más evidencias que sugieren la existencia de estructuras terciarias básicas que reflejan relaciones evolutivas con mayor precisión que los

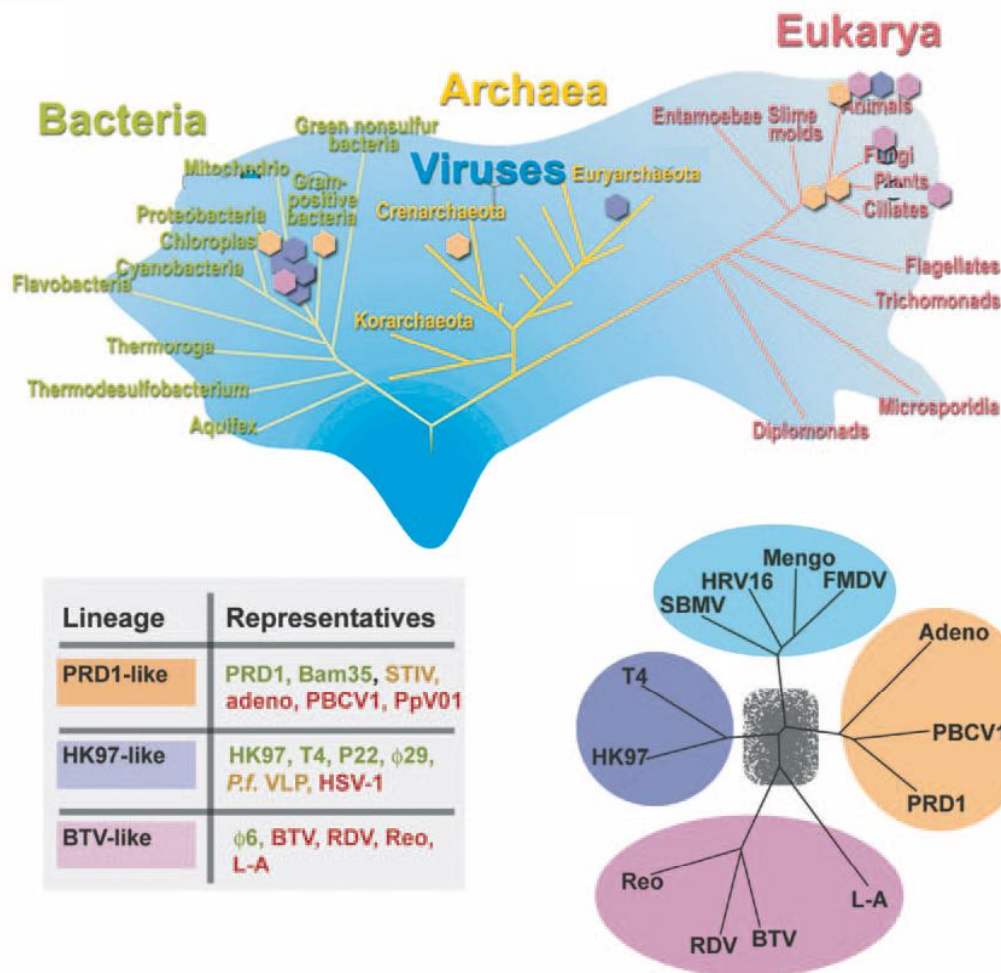
simples análisis de secuencias. Por ejemplo, la cápsida de los picornavirus está constituida por tres CP distintas sin apenas similitud de secuencia entre ellas y forman una cápsida  $P=3$ . Sin embargo, como muchas CP de virus de plantas que forman cápsidas  $T=3$ , las CP de picornavirus tienen el dominio del barril  $\beta$  ampliamente extendido entre los virus icosaédricos (Rossmann & Johnson, 1989). Los conectores virales, máquinas macromoleculares que llevan a cabo el empaquetamiento del dsDNA genómico en el interior de la cápsida es otro ensamblado macromolecular que comparte un plegamiento similar entre distintos virus y bacteriófagos, a pesar de la gran diversidad de secuencias (Agirrezabala et al., 2005).

Cuando la similitud y/o homología de secuencia está limitada entre las CP, las comparaciones estructurales son utilizadas para establecer relaciones entre distintos virus (Baker et al., 2005; Bamford et al., 2005; Rossmann & Johnson, 1989). Así, estos análisis han permitido detectar relaciones entre virus que infectan organismos muy distantes en la evolución, y se distinguen al menos cuatro linajes entre los virus icosaédricos (Bamford et al., 2005; Benson et al., 2004; Krupovic & Bamford, 2008; Riffel et al., 2002). Además de los virus relacionados con los picornavirus, se distinguen otros tres grupos: los que comparten similitudes estructurales con el bacteriófago PRD1, con el bacteriófago HK97, o con el virus dsRNA de la lengua azul (*Bluetongue virus*, BTV). Aunque muchos virus no están incluidos en estos cuatro linajes, el número de plegamientos proteicos que satisfacen los requerimientos de ensamblaje para una cápsida viable se piensa que es limitado (Fig. 34).

Mientras que las CP de las cápsidas  $T=1$  de los Reoviridae comparten un plegamiento similar reconocible sugiriendo un ancestro común, la proteína Gag del virus L-A tiene una estructura bastante distinta, y los métodos tradicionales de relaciones filogenéticas apenas permiten identificar regiones similares. Sin embargo, el plegamiento de la proteína Gag se agrupa dentro del linaje de BTV, aunque siendo la estructura más distante dentro del árbol filogenético. Así, 219 residuos de Gag y la CP de BTV son emparejados estructuralmente situando el virus L-A en la base del árbol filogenético del linaje de BTV (Bamford et al., 2005; Benson et al., 2004; Krupovic & Bamford, 2008; Riffel et al., 2002).

El plegamiento conservado de cada mitad de la CP de PcV en la CP del virus L-A puede sugerir un plegamiento ancestral de las CP de las cápsidas  $T=2$ , y revelar relaciones evolutivas estructurales en el linaje de los virus dsRNA.





**Figura 34. Linajes virales basados en comparaciones de estructuras de CP a resolución atómica.** (A) Arbol filogenético basado en las secuencias del rRNA mostrando los tres dominios de la vida susceptibles a ser infectados por virus (verde, Bacteria, amarillo, Archaea; rojo, Eukarya). La tabla indica algunos virus de los linajes de PRD1, HK-97 y BTV (cada linaje viral tiene asociado un color). (B) Arbol filogenético de los virus basado en la estructura atómica de las CP virales (Bamford et al., 2005).

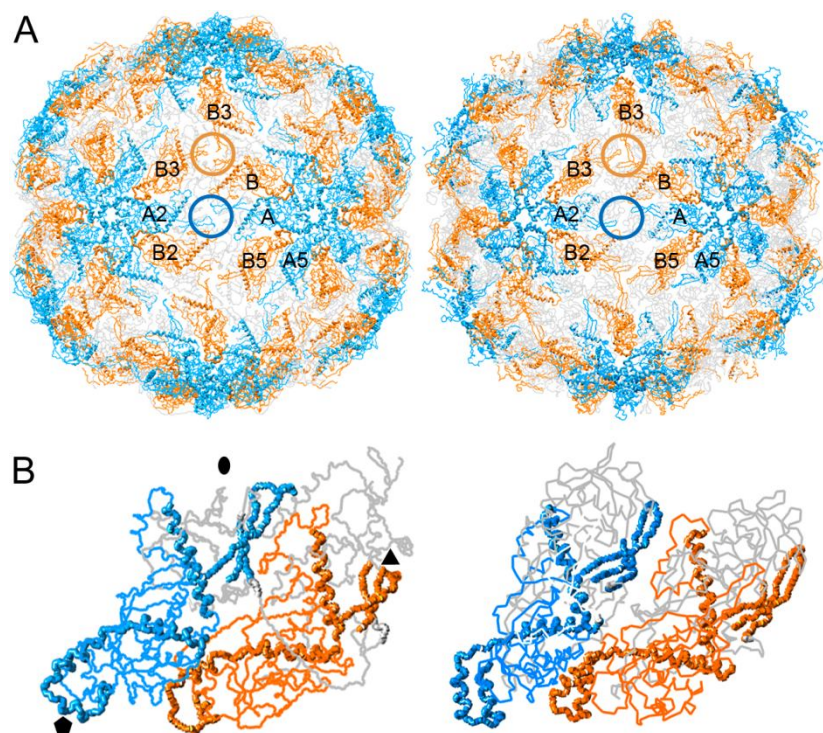
La mitades N- y C-terminal de la CP de PcV constituyen el polipéptido más pequeño de las proteínas T=2 de los virus dsRNA, de ~350 residuos (las CP de los partitivirus PsV-F y PsV-S son de 420 y 434 aminoácidos). La superposición estructural de ambas mitades mediante una translación de ~45 Å muestra que existe una excelente correspondencia entre numerosos SSE de cada mitad, mucho más fidedigna que la obtenida con el mapa a resolución subnanométrica (Luque et al., 2010). La comparación de las dos mitades revela no sólo la coincidencia de hélices  $\alpha$  equivalentes, sino también la misma polaridad de las hélices que solapan. Además, las regiones planas que corresponden a láminas  $\beta$  están constituidas por el mismo número de cadenas  $\beta$  equivalentes. Una característica inesperada, como consecuencia de esta comparación estructural, es la detección de un único sitio preferencial para inserciones de péptidos de tamaño

variable, entre 50 y 100 residuos para PcV, que precede a la cadenas  $\beta 11$  y  $\beta 20$  de las mitades A y B, respectivamente. La existencia de una única “zona caliente” de evolución tendría un objetivo doble: por un lado permite adquirir nuevas funciones a partir de la incorporación de nuevos segmentos peptídicos de tamaño relativamente variado y, por otro, evita alteraciones estructurales del dominio básico de las subunidades estructurales de la cápsida T=2. Es decir, los requerimientos estructurales para la funcionalidad de la cápsida T=2 actúan como una restricción evolutiva.

Estos análisis sugieren además que el dominio básico que está duplicado en la CP de PcV podría representar un dominio que evolucionó a partir del dominio ancestral de las CP T=2 hasta las estructuras tan variadas que observamos hoy en día. Si esta hipótesis es correcta, algunos vestigios estructurales del motivo conservado de PcV deben estar presentes en las CP de cápsidas T=2 modernas. La superposición de Gag sobre cualquiera de los elementos de PcV, manteniendo la misma orientación espacial que en la cápsida, mostró numerosos SSE con distribuciones espaciales similares. De hecho, se detectó el mismo patrón de “colocalización de SSE” que cuando se superponen las mitades A y B de PcV, excepto la hélice  $\alpha 8$  y la cadena  $\beta 7$  de la mitad A de PcV que no tienen SSE equivalentes en Gag. Esta combinación estructural indica sin ambigüedades un motivo compartido para estas dos CP que se ensamblan en una cápsida T=2. La conservación de un plegamiento ancestral en PcV y Gag a lo largo de la evolución quizá sea una consecuencia de la transmisión intracelular en eucariotas simples (son virus de hongos sin una fase extracelular en su ciclo de vida), lo que les permite eludir las altas tasas de mutación de los virus transmitidos extracelularmente en eucariotas superiores, a pesar de que sus genomas y complejidad funcionales son lo suficientemente distintos para ser agrupados en dos familias diferentes. La mayor parte de las similitudes estructurales están localizadas en la región N-terminal de Gag (residuos 26-416). Además de la inserciones en los extremos N- y C-terminal de Gag, similares en las mitades de la CP de Gag, se localizan tres “zonas calientes”, con inserciones de 41, 19 y 170 residuos, en la superficie externa de la cápsida. La inserción más grande que constituye gran parte de la región C-terminal de Gag coincide con la única “zona caliente” que tiene lugar en las mitades A y B de PcV, confirmando que se trata de un sitio preferencial (y ancestral?) que admite la incorporación de variaciones sin alterar el motivo estructural y funcional de los virus dsRNA. El dominio básico conservado en PcV y L-A admite variabilidad adicional mediante inserciones en otras dos zonas localizadas en hacia la zona central del dominio conservado, específicamente después de las hélices  $\alpha 7$  y  $\alpha 11$  de PcV (o  $\alpha 5$  y  $\alpha 10$  de L-A). La inserción de 41 residuos después de la hélice  $\alpha 6$  incluye un *loop* implicado en la actividad de *decapping* de Gag. Esta actividad reside en la His-154 (Tang et al., 2005), a la que se le unen los grupos  $m^7GMP$ , y se localiza en el *loop* 144-163 (Fig. 32, *loop* amarillo). Es plausible que las inserciones en Gag y la CP de PcV, además de una función

estructural, puedan ser responsables de alguna actividad enzimática. Estas predicciones estructurales y funcionales pueden ser verificadas mediante la construcción de CP quiméricas y al análisis de los productos de ensamblaje.

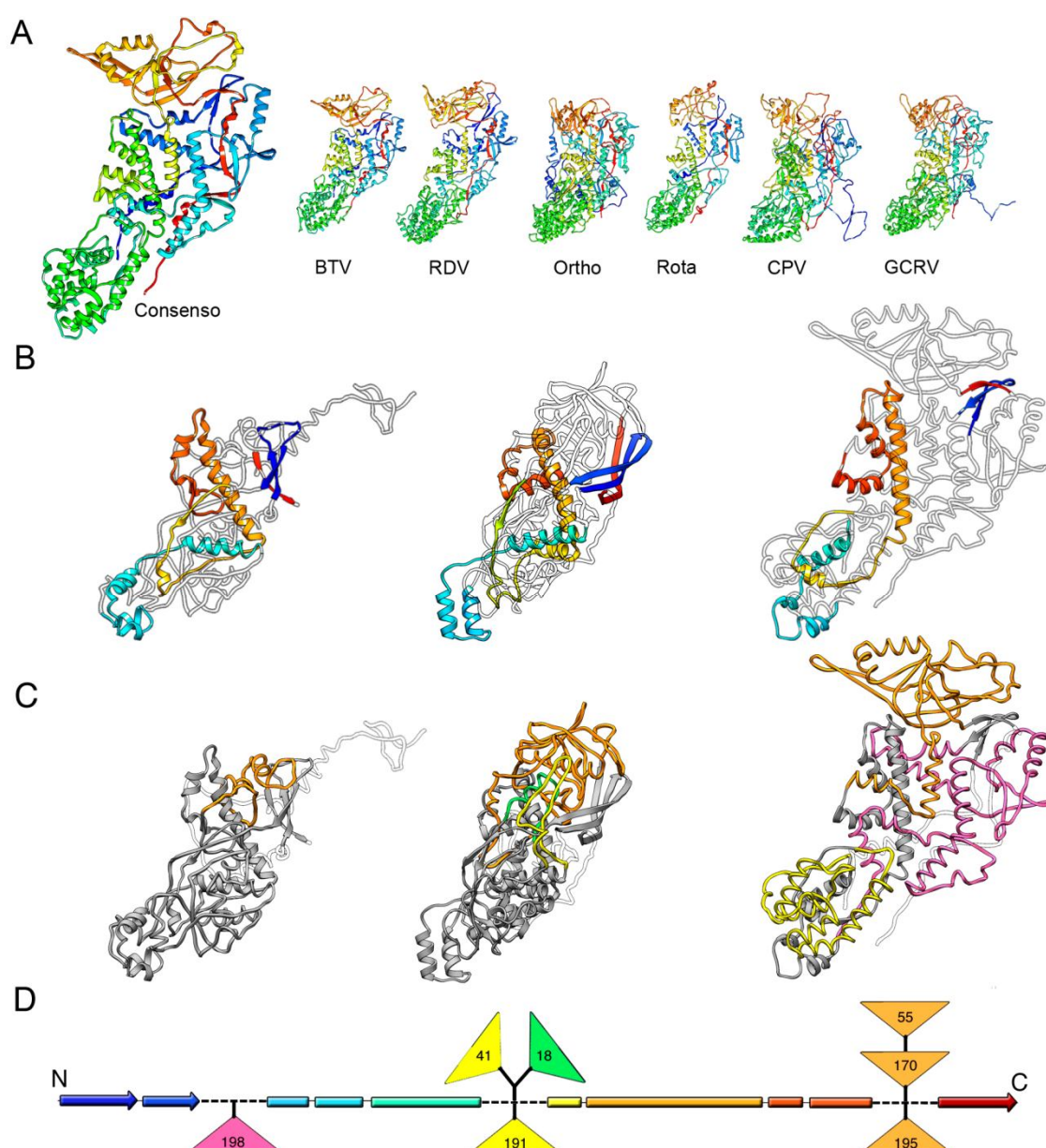
Considerando el ensamblaje de las cápsidas T=2 de L-A y T=1 de PcV, los SSE conservados en ambas CP indican que las interacciones que se preservan son las que tienen lugar en el eje de simetría de orden cinco de la subunidad (o mitad) A, y las interacciones laterales entre las subunidades (o mitades) A y B. Así se favorecería la formación espontánea de intermediarios morfológicos del ensamblaje como son los dímeros y decámeros (o pentámeros para PcV). La interacciones en los ejes de simetría de orden dos y tres son más reducidas pero también presentan cierta conservación de las láminas  $\beta$  próximas (Fig. 35).



**Figura 35. Comparación de las cápsidas de PcV y L-A.** Izquierda: cápsida de PcV. En azul se señala los elementos conservados con L-A del dominio A. En naranja se señala los elementos conservados con L-A del dominio B. los círculos indican las interacciones que tienen lugar en los ejes de simetría de orden dos (azul) y orden tres (naranja). Las letras indican las relaciones de simetría con la subunidad asimétrica. Las hélices  $\alpha$  que forman el eje pentamérico y la hélice  $\alpha$  larga característica están resaltadas. Derecha: cápsida de LA. En azul se señala los elementos conservados con PcV de la molécula A. En naranja se señala los elementos conservados con PcV de la molécula B

El núcleo de hélices  $\alpha$  conservado en cada mitad de la CP de PcV puede considerarse una característica estructural distintiva ya que ha sido preservado parcialmente en otros virus dsRNA. Las CP de Reoviridae son mucho más grandes que los elementos de PcV; las CP VP3,

P3 CPS y  $\lambda$  son casi cuatro veces mas grandes que cada mitad preservada de PcV. Una comparación estructural sistemática entre las CP de los reovirus y el dominio helicoidal conservado de PcV muestra los SSE preservados en tres subdominios: tres hélices  $\alpha$  implicadas en las interacciones alrededor y próximas al eje de simetría de orden cinco (hélices  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  y  $\alpha_6$ ), la hélice  $\alpha$  larga tangencial a la superficie de la cápsida (hélice  $\alpha_{13}$ ) y tres hélices  $\alpha$  pequeñas próximas (hélices  $\alpha_{12}$ ,  $\alpha_{14}$  y  $\alpha_{15}$ ), y la lámina  $\beta$  también preservada entre L-A y PcV constituida por las cadenas  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_{11}$  (Fig. 36).



**Figura 36. Comparación de las cápsidas de PcV, L-A y reovirus.** (A) Estructura atómica consenso de la CP de las cápsidas T=2 de reovirus derivada con el programa DALI utilizando las CP de los virus GCRV, BTV, Rovirs, CPV, Orthoreovirus y RDV. (B) Regiones comunes entre la mitad A de PcV (izquierda), Gag de L-A (centro) y la estructura consenso de reovirus (derecha). Los elementos

conservados están coloreados desde la región N-terminal (azul) hasta C-terminal (rojo). (C) Regiones no comunes entre estas proteínas. Los elementos conservados se indican en gris, y en magenta, violeta, verde y naranja las inserciones. (D) Esquema de los SSE conservados. Los triángulos de colores representan las inserciones. Los números dentro de los triángulos representan la cantidad de residuos que pertenecen a la inserción. Las barras representan hélices  $\alpha$  y las flechas de colores cadenas  $\beta$ .

Una sucesión de eventos evolutivos divergentes en el plegamiento ancestral de PcV, mediante inserciones en sitios preferenciales del núcleo de hélices  $\alpha$  (equivalentes a los detectados en Gag) puede desembocar en las estructuras más complejas observadas en las estructuras homólogas actuales (comparten una historia evolutiva). Los tres subdominios conservados en las CP de los virus dsRNA conforman el armazón de la CP ya que están distribuidos estratégicamente a lo largo de la estructura.

Las CP de partitivirus y picobirnavirus son similares entre ellas, pero no con otros virus dsRNA, y constituirían un modelo de evolución convergente hacia una cápsida T=1 con los mismos requerimientos funcionales, pero distinta estructura cuaternaria. Es decir serían estructuras análogos respecto a las CP de reovirus, totivirus y chrysovirus.

### 5.3 Funciones de la cápsida T=2

La estequiometría de la cápsida está probablemente relacionada con las numerosas actividades vinculadas con la síntesis de RNA (Lawton et al., 2000b), como organizador del genoma y los complejos replicativos, y como compartimentos moleculares que aíslan las moléculas de dsRNA o los intermediarios replicativos. La cápsida de los reovirus además actúa como base de nucleación para el ensamblaje de la cápsida externa T=13.

Los virus dsRNA de eucariotas simples unicelulares, como el virus L-A y PcV, que son transmitidos por intercambio del citoplasma y carecen de fase extracelular, no tienen cápsidas externas y por tanto no han desarrollado mecanismos de entrada en la célula huésped. Las características particulares de las superficies de las CP reflejan estas funciones distintas; la superficies externas de las CP de L-A y PcV son muy corrugadas, y Gag tiene una actividad de *decapping*. Esta actividad reside en la His-154 (Tang et al., 2005), a la que se le unen los grupos  $m^7GMP$ , y se localiza en el loop 144-163 (localizado en la inserción de 41 residuos indicada en la Fig. 31). Es plausible que la CP de PcV, además de su función estructural, pueda desarrollar alguna actividad enzimática como la proteína Gag de L-A. Los viriones de PcV se acumulan en el citoplasma de la célula infectada en grandes agregados en el interior de vesículas (Border et al., 1972), y las regiones protuberantes en la superficie externa pueden ser importantes en la agregación de las partículas virales y en la unión a membranas. Esta unión podría ser crítica para la supervivencia del virus, ya que el dsRNA liberado de los viriones libres es un potente inductor de las repuestas de defensa intracelular del huésped.



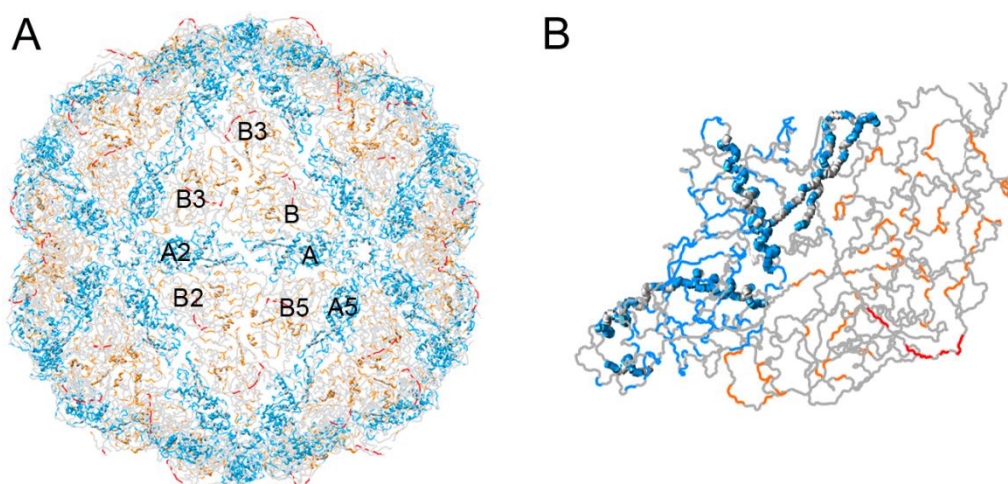
## 5.4 Interacciones del dsRNA con la proteína de la cápsida de chrysovirus

Algunos virus ssRNA de polaridad positiva, como los nodavirus de invertebrados y otros virus de planta (Schneemann, 2006; Tang et al., 2001) presentan regiones del genoma que interaccionan con las subunidades de las CP en posiciones equivalentes simétricas.



### 5.5 Interacciones del dsRNA con la proteína de la cápsida de chrysovirus

Algunos virus ssRNA de polaridad positiva, como los nodavirus de invertebrados y otros virus de planta (Schneemann, 2006; Tang et al., 2001) presentan regiones del genoma que interactúan con las subunidades de las CP en posiciones equivalentes simétricas. La estructura promediada de estas regiones ordenadas ha sido visualizada a alta resolución como un dúplex de RNA. El tamaño del genoma visualizado es variable, y el ssRNA está localizado en los ejes de simetría de orden 2 y 3 del virión. En el virus Pariacoto (PaV), el ssRNA forma un marco dodecárico en estrecho contacto con la cara interna de la cápsida y constituye el ~35 % del RNA encapsidado (Johnson et al., 2004; Tang et al., 2001). Otros estudios de crio-ME con rotavirus también mostraron que el dsRNA está organizado en una caja dodecaédrica (Lawton et al., 1997a; Prasad et al., 1996). Análisis mediante cristalografía de rayos X también muestran que la capa externa de RNA está organizada de forma similar en las nucleocápsidas del orbivirus BTB (Gouet et al., 1999). Este elevado nivel de organización está probablemente relacionado con las reacciones de replicación y transcripción de los segmentos genómicos dentro de la cápsida T=1 que tiene lugar simultáneamente, pero de forma independiente.



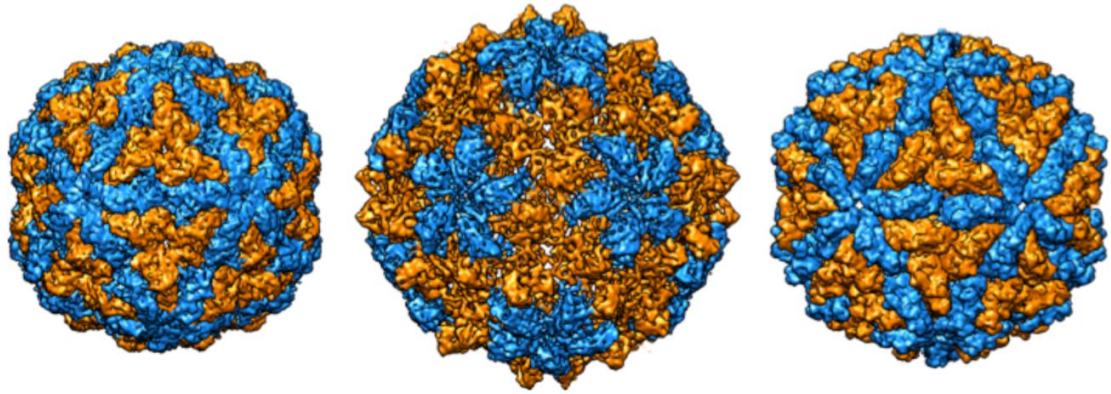
**Figura 38, Regiones conservadas de las cápsidas de chrysovirus.** (A) Cápsida de PcV. En azul y naranja se señalan los segmentos conservados en las secuencias de distintos chrysovirus de los dominios A y B, respectivamente.

Los virus de la familia Reoviridae tienen 10, 11 o 12 segmentos de dsRNA, empaquetados en la misma relación. Los distintos segmentos genómicos deben ser transportados a través de los sitios activos de los complejos de RdRP en los ejes de simetría de orden 5. Y el movimiento de la cadena molde es un factor limitante. El virus L-A es una versión simplificada de los reovirus, con un genoma constituido por un único segmento; y sólo tiene 1 o 2 copias del complejo RdRp, covalentemente unido en el interior de la superficie de la cápsida ya que se expresa como



una proteína de fusión con la CP. En la estructura del virus L-A no se detectaron segmentos de RNA ordenados probablemente debido a que la cápsida del virus L-A es mas espaciosa y el dsRNA está empaquetado mas holgadamente en comparación con la densidad de dsRNA de las partículas replicativas de reovirus. Análisis previos mostraron que la cápsida de PcV tiene una densidad de dsRNA similar a la del virus L-A (considerando una molécula de dsRNA promedio por partícula de 3.2 kbp). El genoma promedio de PcV (2.2 MDA) ocupa un volumen de 2,270 nm<sup>3</sup>, asumiendo una densidad de dsRNA de 1,61 g cm<sup>-3</sup> (Caston et al., 2003). El volumen del genoma es 2,300 nm<sup>3</sup>, y el 50% se localiza en la capa de RNA ordenado. Estos cálculos indican que el dsRNA desordenado está empaquetado con una densidad relativamente baja (17 bp/100 nm<sup>3</sup>). Pero a diferencia del virus L-A, la RdRp de PcV no se expresa como una proteína de fusión con la CP, y esta menor densidad en la región central y el consiguiente incremento en la movilidad del dsRNA podrían ser necesarios para una actividad máxima de RNA polimerasa.

El mapa a resolución atómica de la CP de PcV indican que el dominio duplicado de PcV no es un mero bloque estructural, sino que comprende un elemento funcional conservado. Mientras que existen numerosos estudios funcionales y estructurales en la familia Reoviridae, es necesario una mejor caracterización de muchos virus dsRNA de hongos y protozoos. Estudios recientes en virus de hongos de la familia PARTitiviridae han identificado las primeras cápsidas T=1 formadas por dímeros de CP cuasi-simétricos (Ochoa et al., 2008; Pan et al., 2009)); los picobirnavirus que infectan eucariotas superiores tienen una reestructural similar a la de los partitivirus (Duquerroy et al., 2009a). Otro ejemplo notable es el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV), un patógenos de las gambas con una cápsida similar a la de los totivirus con 120 subunidades. La superficie de la cápsida de IMNV tiene fibras en los ejes de orden cinco, que están probablemente implicados en la entrada celular, ya que este virus se transmite extracelularmente (Rossmann & Johnson, 1989). En el laboratorio hemos determinado la estructura tridimensional del quadrvirus 1 del ascomiceto *Rosellinia necatrix* (RnQV1). La organización del genoma así como los análisis filogenéticos sugieren que RnQV1 es un micovirus dsRNA con un genoma cuádruple (dsRNA1 a dsRNA 4) que difiere de todos los micovirus (Lin et al., 2012). La cápsida de RnQV1, de ~45 nm de diámetro, está formada por dímeros de 2 CP distintas codificadas por los segmentos dsRNA2 y dsRNA4. Estos heterodímeros presentan una organización cuaternaria similar a la de los reovirus, totivirus y chrysovirus, consistente con la idea que las cápsidas T=1 de 120 subunidades es una arquitectura conservada que optimiza la predicación y organización del dsRNA. La cápsida de RnQV1 es la primera cápsida pseudo T=1 (o “P=2”).



**Figura 39, Estructura de las cápsidas de Pcv, RnQV1 y L-A**



## ***6. Conclusiones***



1. La cápsida del chrysovirus 1 de *Cryphonectria nitschkei* (CnCV1) está formada por 60 subunidades. La proteína de la cápsida está formada por un dominio helicoidal repetido. La disposición de la mayor parte de los elementos de estructura secundaria está conservada en la proteína de la cápsida del virus de *Penicillium chrysogenum*. Este plegamiento inusual entre los virus dsRNA está, por tanto, extendido entre los chrysovirus.

2. La estructura atómica de la proteína de la cápsida de 982 residuos de PcV ha sido determinada a  $\sim 4$  Å de resolución a partir de imágenes de criomicroscopía electrónica. El modelo atómico de la cápsida muestra los contactos críticos entre las subunidades estructurales que posibilitan el ensamblaje de la cápsida, y las interacciones específicas RNA-proteína en la superficie interna de la cápsida.

3. La proteína de la cápsida de PcV es una duplicación casi perfecta de un único dominio, en el que la mayoría de las hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$  de una mitad se superponen con las de la otra. Ambas mitades presentan un único sitio preferencial para la inserción de secuencias que les permite adquirir variaciones estructurales y funcionales, y están fusionadas covalentemente por un segmento peptídico accesible en la superficie externa de la cápsida.

4. El motivo estructural de la proteína de la cápsida de PcV está preservado en su homólogo del totivirus L-A, conservando el mismo sitio preferencial para nuevas inserciones peptídicas. Estos análisis estructurales revelan otras dos nuevas zonas de inserción que también son identificadas en comparaciones estructurales con otros virus dsRNA de los reovirus. La evolución del linaje de las proteínas de la cápsida de los virus dsRNA puede ser visualizada, por tanto, a partir de un plegamiento básico helicoidal cuya complejidad estructural se ha incrementado a través de inserciones en tres sitios preferenciales.





## ***7. Bibliografía***



- Abrescia, N. G., Bamford, D. H., Grimes, J. M. & Stuart, D. I. (2012). Structure unifies the viral universe. *Annu Rev Biochem*, 81, 795-822.
- Abrescia, N. G., Cockburn, J. J., Grimes, J. M., Sutton, G. C., Diprose, J. M., Butcher, S. J., Fuller, S. D., San Martin, C., Burnett, R. M., Stuart, D. I., Bamford, D. H. & Bamford, J. K. (2004). Insights into assembly from structural analysis of bacteriophage PRD1. *Nature*, 432(7013), 68-74.
- Adamczak, R., Porollo, A. & Meller, J. (2004). Accurate prediction of solvent accessibility using neural networks-based regression. *Proteins*, 56(4), 753-767.
- Agirrezabala, X., Martin-Benito, J., Valle, M., Gonzalez, J. M., Valencia, A., Valpuesta, J. M. & Carrascosa, J. L. (2005). Structure of the connector of bacteriophage T7 at 8Å resolution: structural homologies of a basic component of a DNA translocating machinery. *J Mol Biol*, 347(5), 895-902.
- Armougom, F., Moretti, S., Poirot, O., Audic, S., Dumas, P., Schaeli, B., Keduas, V. & Notredame, C. (2006). Espresso: automatic incorporation of structural information in multiple sequence alignments using 3D-Coffee. *Nucleic Acids Res*, 34(Web Server issue), W604-608.
- Baker, M. L., Abeysinghe, S. S., Schuh, S., Coleman, R. A., Abrams, A., Marsh, M. P., Hryc, C. F., Ruths, T., Chiu, W. & Ju, T. (2011). Modeling protein structure at near atomic resolutions with Gorgon. *J Struct Biol*, 174(2), 360-373.
- Baker, M. L., Jiang, W., Rixon, F. J. & Chiu, W. (2005). Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages. *J Virol*, 79(23), 14967-14970.
- Baker, M. L., Ju, T. & Chiu, W. (2007). Identification of secondary structure elements in intermediate-resolution density maps. *Structure*, 15(1), 7-19.
- Baker, M. L., Zhang, J., Ludtke, S. J. & Chiu, W. (2010). Cryo-EM of macromolecular assemblies at near-atomic resolution. *Nat Protoc*, 5(10), 1697-1708.
- Baker, T. S., Olson, N. H. & Fuller, S. D. (1999). Adding the Third Dimension to Virus Life Cycles: Three-Dimensional Reconstruction of Icosahedral Viruses from Cryo-Electron Micrographs. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(4), 862-922.
- Bamford, D. H., Grimes, J. M. & Stuart, D. I. (2005). What does structure tell us about virus evolution? *Curr Opin Struct Biol*, 15(6), 655-663.
- Benson, S. D., Bamford, J. K., Bamford, D. H. & Burnett, R. M. (2004). Does common architecture reveal a viral lineage spanning all three domains of life? *Mol Cell*, 16(5), 673-685.

- Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Nakamura, H. & Markley, J. L. (2012). The future of the protein data bank. *Biopolymers*.
- Border, D. J., Buck, K. W., Chain, E. B., Kempson-Jones, G. F., Lhoas, P. & Ratti, G. (1972). Viruses of *Penicillium* and *Aspergillus* species. *Biochem J*, 127(2), 4P-6P.
- Böttcher, B., Kiselev, N. A., Stel'mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A. V. & Crowther, R. A. (1997). Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol*, 71(1), 325-330.
- Buck, C. B. & Trus, B. L. (2012). The papillomavirus virion: a machine built to hide molecular Achilles' heels. *Adv Exp Med Biol*, 726, 403-422.
- Buck, K. W. & Girvan, R. F. (1977). Comparison of the biophysical and biochemical properties of *Penicillium cyaneo-fulvum* virus and *Penicillium chrysogenum* virus. *J. Gen. Virol.*, 34(1), 145-154.
- Butcher, S. J., Dokland, T., Ojala, P. M., Bamford, D. H. & Fuller, S. D. (1997). Intermediates in the assembly pathway of the double-stranded RNA virus phi6. *Embo J*, 16(14), 4477-4487.
- Cardone, G., Purdy, J. G., Cheng, N., Craven, R. C. & Steven, A. C. (2009). Visualization of a missing link in retrovirus capsid assembly. *Nature*, 457(7230), 694-698.
- Caspar, D. L. & Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 27, 1-24.
- Castón, J. R. & Carrascosa, J. L. (2013). The basic architecture of viruses. In *Structure and Physics of Viruses*, vol. in press (ed. M. G. Mateu), pp. 718. The Netherlands.
- Caston, J. R., Ghabrial, S. A., Jiang, D., Rivas, G., Alfonso, C., Roca, R., Luque, D. & Carrascosa, J. L. (2003). Three-dimensional structure of penicillium chrysogenum virus: a double-stranded RNA virus with a genuine T=1 capsid. *J Mol Biol*, 331(2), 417-431.
- Castón, J. R., Luque, D., Gómez-Blanco, J. & Ghabrial, S. A. (2013). Chrysovirus Structure: Repeated Helical Core as Evidence of Gene Duplication. In *Adv Virus Res*, vol. 86 (ed. S. A. Ghabrial): Academic Press.
- Castón, J. R., Luque, D., Trus, B. L., Rivas, G., Alfonso, C., Gonzalez, J. M., Carrascosa, J. L., Annamalai, P. & Ghabrial, S. A. (2006). Three-dimensional structure and stoichiometry of *Helminthosporium victoriae* 190S totivirus. *Virology*, 347(2), 323-332.
- Castón, J. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J. F., Casal, J. I. & Carrascosa, J. L. (2001a). C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J Virol*, 75(22), 10815-10828.

- Castón, J. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J. F., Casal, J. I. & Carrascosa, J. L. (2001b). C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J. Virol.*, 75(22), 10815-10828.
- Castón, J. R., Rodríguez, J. F. & Carrascosa, J. L. (2008). Infectious Bursal Disease Virus (IBDV): A Segmented Double-Stranded RNA Virus With a T=13 Capsid That Lacks a T=1 Core. In *Segmented double-stranded RNA viruses: structure and molecular biology* The Lancet Infectious Diseases, vol. 8 (ed. J. T. Patton), pp. 224: Caister Academic Press.
- Caston, J. R., Trus, B. L., Booy, F. P., Wickner, R. B., Wall, J. S. & Steven, A. C. (1997). Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J Cell Biol*, 138(5), 975-985.
- Castón, J. R., Trus, B. L., Booy, F. P., Wickner, R. B., Wall, J. S. & Steven, A. C. (1997). Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J. Cell. Biol.*, 138(5), 975-985.
- Conway, J. F., Trus, B. L., Booy, F. P., Newcomb, W. W., Brown, J. C. & Steven, A. C. (1993). The effects of radiation damage on the structure of frozen hydrated HSV-1 capsids. *J. Struct. Biol.*, 111(3), 222-233.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B. & Rey, F. A. (2005). The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, 120(6), 761-772.
- Crowther, R. A., Derosier, D. J. & Klug, A. (1970). The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its applications to electron microscopy. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 317, 319-340.
- Cuff, J. A. & Barton, G. J. (2000). Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins*, 40(3), 502-511.
- Chen, D. H., Baker, M. L., Hryc, C. F., Dimaio, F., Jakana, J., Wu, W., Dougherty, M., Haase-Pettingell, C., Schmid, M. F., Jiang, W., Baker, D., King, J. A. & Chiu, W. (2011). Structural basis for scaffolding-mediated assembly and maturation of a dsDNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(4), 1355-1360.
- Chen, J. Z., Settembre, E. C., Aoki, S. T., Zhang, X., Bellamy, A. R., Dormitzer, P. R., Harrison, S. C. & Grigorieff, N. (2009). Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(26), 10644-10648.
- Cheng, L., Zhu, J., Hui, W. H., Zhang, X., Honig, B., Fang, Q. & Zhou, Z. H. (2010). Backbone model of an aquareovirus virion by cryo-electron microscopy and bioinformatics. *J Mol Biol*, 397(3), 852-863.

- Cheng, R. H., Castón, J. R., Wang, G.-J., Gu, F., Smith, T. J., Baker, T. S., Bozarth, R. F., Trus, B. L., Cheng, N., Wickner, R. B. & Steven, A. C. (1994). Fungal Virus Capsids, Cytoplasmic Compartments for the Replication of Double-stranded RNA, Formed as Icosahedral Shells of Asymmetric Gag Dimers. *J. Mol. Biol.*, 244(3), 255-258.
- Chiu, W., Baker, M. L., Jiang, W., Dougherty, M. & Schmid, M. F. (2005). Electron cryomicroscopy of biological machines at subnanometer resolution. *Structure*, 13(3), 363-372.
- Dinman, J. D., Icho, T. & Wickner, R. B. (1991). A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(1), 174-178.
- Dokland, T. (2000). Freedom and restraint: themes in virus capsid assembly. *Structure*, 8(8), R157-162.
- Dryden, K. A., Farsetta, D. L., Wang, G., Keegan, J. M., Fields, B. N., Baker, T. S. & Nibert, M. L. (1998). Internal/structures containing transcriptase-related proteins in top component particles of mammalian orthoreovirus. *Virology*, 245(1), 33-46.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W. & Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.*, 21(2), 129-228.
- Duquerroy, S., Da Costa, B., Henry, C., Vigouroux, A., Libersou, S., Lepault, J., Navaza, J., Delmas, B. & Rey, F. A. (2009a). The picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry. *EMBO J*, 28(11), 1655-1665.
- Duquerroy, S., Da Costa, B., Henry, C., Vigouroux, A., Libersou, S., Lepault, J., Navaza, J., Delmas, B. & Rey, F. A. (2009b). The picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry. *Embo J*.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32(5), 1792-1797.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66(Pt 4), 486-501.
- Estrozi, L. F. & Navaza, J. (2010). Ab initio high-resolution single-particle 3D reconstructions: the symmetry adapted functions way. *J Struct Biol*, 172(3), 253-260.
- Estrozi, L. F., Settembre, E. C., Goret, G., McClain, B., Zhang, X., Chen, J. Z., Grigorieff, N. & Harrison, S. C. (2013). Location of the dsRNA-dependent polymerase, VP1, in rotavirus particles. *J Mol Biol*, 425(1), 124-132.
- Ferentz, A. E. & Wagner, G. (2000). NMR spectroscopy: a multifaceted approach to macromolecular structure. *Q Rev Biophys*, 33(1), 29-65.

- Fernandez, J. J., Luque, D., Caston, J. R. & Carrascosa, J. L. (2008). Sharpening high resolution information in single particle electron cryomicroscopy. *J Struct Biol*, 164(1), 170-175.
- Fokine, A., Chipman, P. R., Leiman, P. G., Mesyanzhinov, V. V., Rao, V. B. & Rossmann, M. G. (2004). Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(16), 6003-6008.
- Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M. & Leith, A. (1996). SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol*, 116(1), 190-199.
- Fuller, S. D., Butcher, S. J., Cheng, R. H. & Baker, T. S. (1996). Three-Dimensional Reconstruction of Icosahedral Particles--The Uncommon Line. *J. Struct. Biol.*, 116(1), 48-55.
- Gertsman, I., Gan, L., Guttman, M., Lee, K., Speir, J. A., Duda, R. L., Hendrix, R. W., Komives, E. A. & Johnson, J. E. (2009). An unexpected twist in viral capsid maturation. *Nature*, 458(7238), 646-650.
- Ghabrial, S. A. & Castón, J. R. (2012). Family Chrysoviridae. In *Virus taxonomy. Ninth Report of the International Committee on taxonomy of viruses* eds. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz), pp. 509-513. Amsterdam: Elsevier. Academic Press.
- Gouet, P., Diprose, J. M., Grimes, J. M., Malby, R., Burroughs, J. N., Zientara, S., Stuart, D. I. & Mertens, P. P. (1999). The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cell*, 97(4), 481-490.
- Grigorieff, N. (2007). FREALIGN: high-resolution refinement of single particle structures. *J Struct Biol*, 157(1), 117-125.
- Grigorieff, N. & Harrison, S. C. (2011). Near-atomic resolution reconstructions of icosahedral viruses from electron cryo-microscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 21(2), 265-273.
- Grimes, J. M., Burroughs, J. N., Gouet, P., Diprose, J. M., Malby, R., Zientara, S., Mertens, P. P. & Stuart, D. I. (1998). The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature*, 395(6701), 470-478.
- Grimes, J. M., Jakana, J., Ghosh, M., Basak, A. K., Roy, P., Chiu, W., Stuart, D. I. & Prasad, B. V. (1997). An atomic model of the outer layer of the bluetongue virus core derived from X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Structure*, 5(7), 885-893.
- Guntert, P. (1998). Structure calculation of biological macromolecules from NMR data. *Q Rev Biophys*, 31(2), 145-237.



- Harrison, S. C. (2007). Principles of virus structure. In *Fields virology*, vol. 1 (ed. D. C. Knipe), pp. 59-98. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hasegawa, H. & Holm, L. (2009). Advances and pitfalls of protein structural alignment. *Curr Opin Struct Biol*, 19(3), 341-348.
- Hendrix, R. W. & Johnson, J. E. (2012). Bacteriophage HK97 capsid assembly and maturation. *Adv Exp Med Biol*, 726, 351-363.
- Heymann, J. B. (2001). Bsoft: image and molecular processing in electron microscopy. *J Struct Biol*, 133(2-3), 156-169.
- Heymann, J. B. & Belnap, D. M. (2007). Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy. *J Struct Biol*, 157(1), 3-18.
- Hill, C. L., Booth, T. F., Prasad, B. V., Grimes, J. M., Mertens, P. P., Sutton, G. C. & Stuart, D. I. (1999a). The structure of a cypovirus and the functional organization of dsRNA viruses. *Nat Struct Biol*, 6(6), 565-568.
- Hill, C. L., Booth, T. F., Prasad, B. V., Grimes, J. M., Mertens, P. P., Sutton, G. C. & Stuart, D. I. (1999b). The structure of a cypovirus and the functional organization of dsRNA viruses. *Nat. Struct. Biol.*, 6(6), 565-568.
- Holm, L. & Rosenstrom, P. (2010). Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res*, 38(Web Server issue), W545-549.
- Hryc, C. F., Chen, D. H. & Chiu, W. (2011). Near-atomic-resolution cryo-EM for molecular virology. *Curr Opin Virol*, 1(2), 110-117.
- Huiskonen, J. T., De Haas, F., Bubeck, D., Bamford, D. H., Fuller, S. D. & Butcher, S. J. (2006). Structure of the bacteriophage phi6 nucleocapsid suggests a mechanism for sequential RNA packaging. *Structure*, 14(6), 1039-1048.
- Irigoyen, N., Caston, J. R. & Rodriguez, J. F. (2012). Host proteolytic activity is necessary for infectious bursal disease virus capsid protein assembly. *J Biol Chem*, 287(29), 24473-24482.
- Jaalinoja, H. T., Huiskonen, J. T. & Butcher, S. J. (2007). Electron cryomicroscopy comparison of the architectures of the enveloped bacteriophages phi6 and phi8. *Structure*, 15(2), 157-167.
- Jiang, D. & Ghabrial, S. A. (2004). Molecular characterization of *Penicillium chrysogenum* virus: reconsideration of the taxonomy of the genus *Chrysovirus*. *J Gen Virol*, 85(Pt 7), 2111-2121.

- Jiang, W., Baker, M. L., Jakana, J., Weigele, P. R., King, J. & Chiu, W. (2008). Backbone structure of the infectious epsilon15 virus capsid revealed by electron cryomicroscopy. *Nature*, 451(7182), 1130-1134.
- Jiang, W., Li, Z., Zhang, Z., Baker, M. L., Prevelige, P. E., Jr. & Chiu, W. (2003). Coat protein fold and maturation transition of bacteriophage P22 seen at subnanometer resolutions. *Nat Struct Biol*, 10(2), 131-135.
- Johnson, J. E. (1996). Functional implications of protein-protein interactions in icosahedral viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1), 27-33.
- Johnson, K. N., Tang, L., Johnson, J. E. & Ball, L. A. (2004). Heterologous RNA encapsidated in Pariacoto virus-like particles forms a dodecahedral cage similar to genomic RNA in wild-type virions. *J Virol*, 78(20), 11371-11378.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*, 292(2), 195-202.
- Jose, J., Snyder, J. E. & Kuhn, R. J. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol*, 4(7), 837-856.
- Ju, T., Baker, M. L. & Chiu, W. (2007). Computing a family of skeletons of volumetric models for shape description. *Comput Aided Des*, 39(5), 352-360.
- Kainov, D. E., Butcher, S. J., Bamford, D. H. & Tuma, R. (2003). Conserved intermediates on the assembly pathway of double-stranded RNA bacteriophages. *J Mol Biol*, 328(4), 791-804.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res*, 30(14), 3059-3066.
- Krol, M. A., Olson, N. H., Tate, J., Johnson, J. E., Baker, T. S. & Ahlquist, P. (1999). RNA-controlled polymorphism in the in vivo assembly of 180-subunit and 120-subunit virions from a single capsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24), 13650-13655.
- Krupovic, M. & Bamford, D. H. (2008). Virus evolution: how far does the double beta-barrel viral lineage extend? *Nat Rev Microbiol*, 6(12), 941-948.
- Laskowski, R. A., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J Mol Biol*, 231(4), 1049-1067.
- Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M. & Pelletier, S. L. (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science* eds. S. E. Harding, A. J. Rowe and J. C. Horton, pp. 90-125. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.

- Lawton, J. A., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (1997a). Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol*, 4(2), 118-121.
- Lawton, J. A., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (1997b). Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat. Struct. Biol.*, 4(2), 118-121.
- Lawton, J. A., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (2000a). Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv. Virus Res.*, 55, 185-229.
- Lawton, J. A., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (2000b). Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv Virus Res*, 55, 185-229.
- Lawton, J. A., Zeng, C. Q., Mukherjee, S. K., Cohen, J., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (1997c). Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer. *J Virol*, 71(10), 7353-7360.
- Li, Z., Baker, M. L., Jiang, W., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (2009). Rotavirus architecture at subnanometer resolution. *J Virol*, 83(4), 1754-1766.
- Liang, Y., Ke, E. Y. & Zhou, Z. H. (2002). IMIRS: a high-resolution 3D reconstruction package integrated with a relational image database. *J Struct Biol*, 137(3), 292-304.
- Liddington, R. C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T. L. & Harrison, S. C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature*, 354(6351), 278-284.
- Lin, K., Simossis, V. A., Taylor, W. R. & Heringa, J. (2005). A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics*, 21(2), 152-159.
- Lin, Y. H., Chiba, S., Tani, A., Kondo, H., Sasaki, A., Kanematsu, S. & Suzuki, N. (2012). A novel quadripartite dsRNA virus isolated from a phytopathogenic filamentous fungus, *Rosellinia necatrix*. *Virology*, 426(1), 42-50.
- Liu, H., Jin, L., Koh, S. B., Atanasov, I., Schein, S., Wu, L. & Zhou, Z. H. (2010). Atomic structure of human adenovirus by cryo-EM reveals interactions among protein networks. *Science*, 329(5995), 1038-1043.
- Lomonosoff, G. P. & Johnson, J. E. (1991). The synthesis and structure of comovirus capsids. *Prog Biophys Mol Biol*, 55(2), 107-137.
- Lu, G., Zhou, Z. H., Baker, M. L., Jakana, J., Cai, D., Wei, X., Chen, S., Gu, X. & Chiu, W. (1998). Structure of Double-Shelled Rice Dwarf Virus. *J. Virol.*, 72(11), 8541-8549.

- Ludtke, S. J., Baldwin, P. R. & Chiu, W. (1999). EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol*, 128(1), 82-97.
- Luque, D., Gonzalez, J. M., Garriga, D., Ghabrial, S. A., Havens, W. M., Trus, B., Verdaguer, N., Carrascosa, J. L. & Caston, J. R. (2010). The T=1 capsid protein of *Penicillium chrysogenum* virus is formed by a repeated helix-rich core indicative of gene duplication. *J Virol*, 84(14), 7256-7266.
- Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F. & Caston, J. R. (2009a). Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(7), 2148-2152.
- Luque, D., Saugar, I., Rojas, M. T., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F. & Caston, J. R. (2009b). Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J Mol Biol*, 386(3), 891-901.
- Luque, D., Saugar, I., Rodriguez, J. F., Verdaguer, N., Garriga, D., Martin, C. S., Velazquez-Muriel, J. A., Trus, B. L., Carrascosa, J. L. & Caston, J. R. (2007). Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J Virol*, 81(13), 6869-6878.
- Marabini, R., Masegosa, I. M., San Martin, M. C., Marco, S., Fernandez, J. J., De La Fraga, L. G., Vaquerizo, C. & Carazo, J. M. (1996). Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy. *J Struct Biol*, 116(1), 237-240.
- Mastrorade, D. N. (2005). Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J Struct Biol*, 152(1), 36-51.
- McClain, B., Settembre, E., Temple, B. R., Bellamy, A. R. & Harrison, S. C. (2010). X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 397(2), 587-599.
- Mindell, J. A. & Grigorieff, N. (2003). Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J Struct Biol*, 142(3), 334-347.
- Morais, M. C., Fisher, M., Kanamaru, S., Przybyla, L., Burgner, J., Fane, B. A. & Rossmann, M. G. (2004). Conformational switching by the scaffolding protein D directs the assembly of bacteriophage phiX174. *Mol Cell*, 15(6), 991-997.
- Naitow, H., Tang, J., Canady, M., Wickner, R. B. & Johnson, J. E. (2002a). L-A virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism. *Nat. Struct. Biol.*, 9(10), 725-728.
- Naitow, H., Tang, J., Canady, M., Wickner, R. B. & Johnson, J. E. (2002b). L-A virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism. *Nat Struct Biol*, 9(10), 725-728.

- Nakagawa, A., Miyazaki, N., Taka, J., Naitow, H., Ogawa, A., Fujimoto, Z., Mizuno, H., Higashi, T., Watanabe, Y., Omura, T., Cheng, R. H. & Tsukihara, T. (2003). The atomic structure of rice dwarf virus reveals the self-assembly mechanism of component proteins. *Structure*, 11(10), 1227-1238.
- Nandhagopal, N., Simpson, A. A., Gurnon, J. R., Yan, X., Baker, T. S., Graves, M. V., Van Etten, J. L. & Rossmann, M. G. (2002). The structure and evolution of the major capsid protein of a large, lipid-containing DNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23), 14758-14763.
- Navaza, J., Lepault, J., Rey, F. A., Alvarez-Rua, C. & Borge, J. (2002). On the fitting of model electron densities into EM reconstructions: a reciprocal-space formulation. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 58(Pt 10 Pt 2), 1820-1825.
- Ochoa, W. F., Havens, W. M., Sinkovits, R. S., Nibert, M. L., Ghabrial, S. A. & Baker, T. S. (2008). Partitivirus structure reveals a 120-subunit, helix-rich capsid with distinctive surface arches formed by quasisymmetric coat-protein dimers. *Structure*, 16(5), 776-786.
- Pan, J., Dong, L., Lin, L., Ochoa, W. F., Sinkovits, R. S., Havens, W. M., Nibert, M. L., Baker, T. S., Ghabrial, S. A. & Tao, Y. J. (2009). Atomic structure reveals the unique capsid organization of a dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(11), 4225-4230.
- Patton, J. T. & Spencer, E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology*, 277(2), 217-225.
- Pei, J., Kim, B. H. & Grishin, N. V. (2008). PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res*, 36(7), 2295-2300.
- Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (2006). Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol*, 309, 189-219.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13), 1605-1612.
- Pollastri, G. & Mclysaght, A. (2005). Porter: a new, accurate server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics*, 21(8), 1719-1720.
- Popa, M. P., Mckelvey, T. A., Hempel, J. & Hendrix, R. W. (1991). Bacteriophage HK97 structure: wholesale covalent cross-linking between the major head shell subunits. *J Virol*, 65(6), 3227-3237.
- Poranen, M. M. & Bamford, D. H. (2012). Assembly of large icosahedral double-stranded RNA viruses. *Adv Exp Med Biol*, 726, 379-402.

- Prasad, B. V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q., Jakana, J., Lawton, J. A., Chiu, W. & Estes, M. K. (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature*, 382(6590), 471-473.
- Prasad, B. V. & Schmid, M. F. (2012). Principles of virus structural organization. *Adv Exp Med Biol*, 726, 17-47.
- Prasad, B. V., Wang, G. J., Clerx, J. P. & Chiu, W. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol*, 199(2), 269-275.
- Qu, C., Liljas, L., Opalka, N., Brugidou, C., Yeager, M., Beachy, R. N., Fauquet, C. M., Johnson, J. E. & Lin, T. (2000). 3D domain swapping modulates the stability of members of an icosahedral virus group. *Structure*, 8(10), 1095-1103.
- Rayment, I., Baker, T. S., Caspar, D. L. & Murakami, W. T. (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature*, 295(5845), 110-115.
- Reinisch, K. M. (2002). The dsRNA Viridae and their catalytic capsids. *Nat. Struct. Biol.*, 9(10), 714-716.
- Reinisch, K. M., Nibert, M. L. & Harrison, S. C. (2000). Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature*, 404(6781), 960-967.
- Riffel, N., Harlos, K., Iourin, O., Rao, Z., Kingsman, A., Stuart, D. & Fry, E. (2002). Atomic resolution structure of Moloney murine leukemia virus matrix protein and its relationship to other retroviral matrix proteins. *Structure*, 10(12), 1627-1636.
- Roberts, M. M., White, J. L., Grutter, M. G. & Burnett, R. M. (1986). Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon. *Science*, 232(4754), 1148-1151.
- Rocchia, W., Sridharan, S., Nicholls, A., Alexov, E., Chiabrera, A. & Honig, B. (2002). Rapid grid-based construction of the molecular surface and the use of induced surface charge to calculate reaction field energies: applications to the molecular systems and geometric objects. *J Comput Chem*, 23(1), 128-137.
- Rosenthal, P. B. & Henderson, R. (2003). Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. *J Mol Biol*, 333(4), 721-745.
- Rossmann, M. G. & Johnson, J. E. (1989). Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem*, 58, 533-573.
- Saugar, I., Luque, D., Ona, A., Rodriguez, J. F., Carrascosa, J. L., Trus, B. L. & Caston, J. R. (2005). Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch. *Structure*, 13(7), 1007-1017.

- Schneemann, A. (2006). The structural and functional role of RNA in icosahedral virus assembly. *Annu Rev Microbiol*, 60, 51-67.
- Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J*, 78(3), 1606-1619.
- Schuck, P., Perugini, M. A., Gonzales, N. R., Howlett, G. J. & Schubert, D. (2002). Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys J*, 82(2), 1096-1111.
- Sen, T. Z., Jernigan, R. L., Garnier, J. & Kloczkowski, A. (2005). GOR V server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics*, 21(11), 2787-2788.
- Settembre, E. C., Chen, J. Z., Dormitzer, P. R., Grigorieff, N. & Harrison, S. C. (2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J*, 30(2), 408-416.
- Shaw, A. L., Rothnagel, R., Chen, D., Ramig, R. F., Chiu, W. & Prasad, B. V. (1993). Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell*, 74(4), 693-701.
- Shaw, A. L., Samal, S. K., Subramanian, K. & Prasad, B. V. (1996). The structure of aquareovirus shows how the different geometries of the two layers of the capsid are reconciled to provide symmetrical interactions and stabilization. *Structure*, 4(8), 957-967.
- Smith, D. J., Saxton, W. O., O'keefe, M. A., Wood, G. J. & Stobbs, W. M. (1983). The importance of beam alignment and crystal tilt in high resolution electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 11(4), 263-281.
- Smyth, M. S. & Martin, J. H. (2000). x ray crystallography. *Mol Pathol*, 53(1), 8-14.
- Steven, A., Trus, B., Booy, F., Cheng, N., Zlotnick, A., Castón, J. & Conway, J. (1997). The making and breaking of symmetry in virus capsid assembly: glimpses of capsid biology from cryoelectron microscopy. *FASEB J.*, 11(10), 733-742.
- Steven, A. C., Heymann, J. B., Cheng, N., Trus, B. L. & Conway, J. F. (2005). Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15(2), 227-236.
- Tang, J., Johnson, J. M., Dryden, K. A., Young, M. J., Zlotnick, A. & Johnson, J. E. (2006). The role of subunit hinges and molecular "switches" in the control of viral capsid polymorphism. *J Struct Biol*, 154(1), 59-67.
- Tang, J., Naitow, H., Gardner, N. A., Kolesar, A., Tang, L., Wickner, R. B. & Johnson, J. E. (2005). The structural basis of recognition and removal of cellular mRNA 7-methyl G 'caps' by a viral capsid protein: a unique viral response to host defense. *J Mol Recognit*, 18(2), 158-168.



- Tang, J., Ochoa, W. F., Sinkovits, R. S., Poulos, B. T., Ghabrial, S. A., Lightner, D. V., Baker, T. S. & Nibert, M. L. (2008). Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(45), 17526-17531.
- Tang, L., Johnson, K. N., Ball, L. A., Lin, T., Yeager, M. & Johnson, J. E. (2001). The structure of pariacoto virus reveals a dodecahedral cage of duplex RNA. *Nat Struct Biol*, 8(1), 77-83.
- Trask, S. D., McDonald, S. M. & Patton, J. T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol*, 10(3), 165-177.
- Vagin, A. A., Steiner, R. A., Lebedev, A. A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F. & Murshudov, G. N. (2004). REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60(Pt 12 Pt 1), 2184-2195.
- Van Heel, M. (1984). Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules). *Ultramicroscopy*, 13(1-2), 165-183.
- Vancini, R., Paredes, A., Ribeiro, M., Blackburn, K., Ferreira, D., Kononchik, J. P. J., Hernandez, R. & Brown, D. (2012). Espirito Santo virus: a new birnavirus that replicates in insect cells. *J. Virol*.
- Velankar, S., Alhroub, Y., Best, C., Caboche, S., Conroy, M. J., Dana, J. M., Fernandez Montecelo, M. A., Van Ginkel, G., Golovin, A., Gore, S. P., Gutmanas, A., Haslam, P., Hendrickx, P. M., Heuson, E., Hirshberg, M., John, M., Lagerstedt, I., Mir, S., Newman, L. E., Oldfield, T. J., Patwardhan, A., Rinaldi, L., Sahni, G., Sanz-Garcia, E., Sen, S., Slowley, R., Suarez-Uruena, A., Swaminathan, G. J., Symmons, M. F., Vranken, W. F., Wainwright, M. & Kleywegt, G. J. (2012). PDBe: Protein Data Bank in Europe. *Nucleic Acids Res*, 40(Database issue), D445-452.
- Wolf, M., Garcea, R. L., Grigorieff, N. & Harrison, S. C. (2010). Subunit interactions in bovine papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(14), 6298-6303.
- Wood, H. A. & Bozarth, R. F. (1972). Properties of viruslike particles of *Penicillium chrysogenum*: one double-stranded RNA molecule per particle. *Virology*, 47(3), 604-609.
- Yu, X., Ge, P., Jiang, J., Atanasov, I. & Zhou, Z. H. (2011). Atomic model of CPV reveals the mechanism used by this single-shelled virus to economically carry out functions conserved in multishelled reoviruses. *Structure*, 19(5), 652-661.
- Yu, X., Jin, L. & Zhou, Z. H. (2008). 3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy. *Nature*, 453(7193), 415-419.

- Zhang, R., Hryc, C. F., Cong, Y., Liu, X., Jakana, J., Gorchakov, R., Baker, M. L., Weaver, S. C. & Chiu, W. (2011). 4.4 Å cryo-EM structure of an enveloped alphavirus Venezuelan equine encephalitis virus. *EMBO J*, 30(18), 3854-3863.
- Zhang, W., Olson, N. H., Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-Mckenna, M., Boulton, M. I., Davies, J. W. & McKenna, R. (2001). Structure of the Maize streak virus geminate particle. *Virology*, 279(2), 471-477.
- Zhang, X., Ge, P., Yu, X., Brannan, J. M., Bi, G., Zhang, Q., Schein, S. & Zhou, Z. H. (2012a). Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol*.
- Zhang, X., Jin, L., Fang, Q., Hui, W. H. & Zhou, Z. H. (2010). 3.3 Å cryo-EM structure of a nonenveloped virus reveals a priming mechanism for cell entry. *Cell*, 141(3), 472-482.
- Zhang, X., Settembre, E., Xu, C., Dormitzer, P. R., Bellamy, R., Harrison, S. C. & Grigorieff, N. (2008). Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(6), 1867-1872.
- Zhang, X., Sun, S., Xiang, Y., Wong, J., Klose, T., Raoult, D. & Rossmann, M. G. (2012b). Structure of Sputnik, a virophage, at 3.5-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(45), 18431-18436.
- Zhang, X., Walker, S. B., Chipman, P. R., Nibert, M. L. & Baker, T. S. (2003). Reovirus polymerase lambda 3 localized by cryo-electron microscopy of virions at a resolution of 7.6 Å. *Nat Struct Biol*, 10(12), 1011-1018.
- Zhang, X. & Zhou, Z. H. (2011). Limiting factors in atomic resolution cryo electron microscopy: no simple tricks. *J Struct Biol*, 175(3), 253-263.
- Zhou, Z. H. (2008). Towards atomic resolution structural determination by single-particle cryo-electron microscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 18(2), 218-228.
- Zhou, Z. H. (2011). Atomic resolution cryo electron microscopy of macromolecular complexes. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 82, 1-35.
- Zhou, Z. H. & Chiu, W. (2003). Determination of icosahedral virus structures by electron cryomicroscopy at subnanometer resolution. *Adv Protein Chem*, 64, 93-124.
- Zhu, J., Cheng, L., Fang, Q., Zhou, Z. H. & Honig, B. (2010). Building and refining protein models within cryo-electron microscopy density maps based on homology modeling and multiscale structure refinement. *J Mol Biol*, 397(3), 835-851.

## **8. *Publicaciones***

